



Sara Cristina Pé-Leve dos Santos

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Análise Elementar em Tecidos Biológicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores : José Paulo Santos,
Professor Associado com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNL
João Goyri O'Neill,
Professor Catedrático,
Faculdade de Ciências Médicas - UNL

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Arguente: Doutora Alda Sofia Pessanha de Sousa Moreno, Pós-Doc FCT-UNL

Vogal: Doutor José Paulo Moreira dos Santos, Professor Associado com Agregação, FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2014

Análise Elementar em Tecidos Biológicos

Copyright © Sara Cristina Pé-Leve dos Santos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*"Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos
gigantes."*

- Isaac Newton -

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Professor Doutor José Paulo dos Santos todo o apoio, disponibilidade e confiança que demonstrou, o incentivo, a coragem que me deu, e também pelo rigor com que me acompanhou. Esteve ao meu lado sempre que necessitei e ensinou-me a melhorar.

Agradeço também ao meu orientador Professor Doutor João Goyri O'Neill por toda a ajuda que me disponibilizou durante todo este tempo.

Queria também agradecer a Doutora Maria Angélica Almeida, ao Doutor Diogo Pais Goyri e ao Doutor Diogo Casal pela disponibilidade, compreensão e ajuda que me foi dada durante todo o trabalho.

À Professora Doutora Maria Luísa Dias de Carvalho queria deixar um obrigado muito grande porque apesar de não ser a minha orientadora ajudou-me, apoiou-me e mostrou-se disponível, estando ao meu lado sempre que necessitei.

Queria deixar um agradecimento especial ao Professor Mário Diniz que se mostrou sempre disponível para me ajudar e me apoiar em todo o meu trabalho.

Ao Professor Mauro Guerra, à Professora Sofia Pessanha e à Professora Marta Manso queria também agradecer por toda a ajuda e disponibilidade que me deram no laboratório.

Gostaria de agradecer também ao biotério da Faculdade de Ciências Médica, à Faculdade de Ciências Médicas e ao centro de Física Atómica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa pelo laboratório e material necessário disponibilizado.

Quero deixar um agradecimento muito especial à minha mãe e ao meu pai que sempre me apoiaram e ajudaram quando necessitei, confiaram em mim e fizeram-me sorrir mesmo nos momentos mais difíceis. Deram-me amor e apoio incondicional que me deu uma grande força para continuar e, hoje terminar, esta etapa.

Quero agradecer também à minha família o apoio e preocupação que sempre mostraram em relação à esta etapa da minha vida.

Quero agradecer ao meu namorado e aos meus amigos, muito deles que foram uma segunda família durante estes últimos anos, pelo incentivo, paciência, apoio e força que me mostraram em bons e maus momentos nesta fase muito importante da minha vida.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização da minha dissertação e do meu curso em Engenharia Biomédica.

Resumo

Os elementos traço são elementos que existem no organismo humano e que se apresentam em concentrações variadas. A variação da concentração destes elementos pode levar a intoxicações ou mesmo à formação de tecidos cancerígenos no organismo humano.

Neste trabalho efectuaram-se dois estudos de elementos traço no organismo, sendo que numa das situações foram utilizados ratos Wistar e na outra situação utilizaram-se amostras de tecidos humanos recolhidos em biópsias.

Foi utilizada a técnica de fluorescência de raios-X na análise de tecidos, nomeadamente, a espectroscopia de micro-fluorescência de raios-X (μ -XRF) e a espectroscopia de energia dispersiva de raios-X com um sistema tri-axial (EDXRF).

No estudo dos ratos Wistar, pretendeu-se analisar a intoxicação por chumbo no organismo através da adição de acetato de chumbo na água ingerida. Conclui-se deste estudo que existe uma correlação positiva entre a acumulação de chumbo no organismo e a sua excreção através das unhas e do pêlo, sendo que o pêlo poderá vir a servir como método de diagnóstico de intoxicação por metais pesados.

No estudo de tecidos cancerígenos pretendeu-se observar as possíveis alterações de elementos no organismo quando o tecido contém uma neoplasia. Analisaram-se amostras de tecidos de rim, pulmão e cólon, saudáveis e com neoplasia e concluiu-se que efectivamente existem alterações nas concentrações de elementos traço de amostras saudáveis para amostras com neoplasia variando estas concentrações de tecido para tecido.

Abstract

Trace elements exist in every part of the human organism and they have varied concentrations. Variations of this concentrations can lead to intoxication or to cancer tissues formations in the human body.

This work is a study of two situations of trace elements in the organism. On the first situation were used Wistar mice and on the other were used human tissues samples collected through biopsy.

There were used x-ray fluorescence technique in tissues analysis, namely, the micro X-ray fluorescence spectroscopy (μ -XRF) and the energy dispersive x-ray fluorescence spectroscopy whit tri-axial system (EDXRF).

On the Wistar mice study, it was intended to analyze lead intoxication in their organism by adding lead acetate in their water. The conclusion of this study is that there is a positive correlation between the lead accumulation in the organism and its excretion by nails and hair, in which the last can be used as a diagnosis method for intoxication trough trace elements.

Regarding to the study of cancer tissues, what was intended is the observation of the trace elements alterations in the organism when the tissue as a cancer. Analyzing samples of kidney, lung and colon tissues, healthy and with cancer it's concluded that there are alterations in the trace elements concentration of healthy samples to cancer samples, ranging among tissues.

Glossário

I_0	Espectro de excitação, 26
I_i	Intensidade da radiação fluorescente, 26
$\frac{S-1}{S}$	Relação do salto, 26
μ	Coefficiente de absorção mássico, 26
μ -XRF	Micro X-Ray Fluorescence, ix , xi , 31 , 37
ψ	Ângulo de incidência, 26
τ	Coefficiente de absorção do fóton, 26
C	Carbono, 59
c	Concentração, 65
Ca	Cálcio, 59 , 79 , 81 , 83 , 91
Cd	Cádmio, 12
Cl	Cloro, 59 , 83 , 91
Cr	Crómio, 12
Cu	Cobre, 59 , 79 , 81
EDXRF	Energy Dispersive X-Ray Fluorescence, ix , xi , 24 , 31 , 37
FCM	Faculdade de Ciências Médicas, 29
Fe	Ferro, 59 , 79 , 81 , 83 , 91
G	Factor de geometria, 26
H	Hidrogénio, 59
K	Potássio, 59 , 79 , 81 , 83 , 91
$K\alpha$	Grupo de Riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios X, 25
$K\beta$	Grupo das segundas riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios X, 25

m	Massa, 65
N	Azoto, 59
n	Número de moles, 65
Na	Sódio, 59
Ni	Níquel, 12
O	Oxigénio, 59
P	Fósforo, 59 , 79 , 81
p	Probabilidade de transmissão, 26
Pb	Chumbo, 79 , 81 , 83 , 91
ppm	Partes por milhão, 25 , 37
Rs	Coeficiente de Correlação de Spearman, 39
S	Enxofre, 59 , 79 , 81 , 83 , 91
Se	Selénio, 59
sig	p-value, 39
Ti	Titânio, 79 , 81
UNL	Universidade Nova de Lisboa, 29
v	Volume, 65
W	Massa molar, 65
w	Campo de fluorescência, 26
XRF	X-Ray fluorescence, 20 , 23
Zn	Zinco, 59 , 79 , 81 , 83 , 91

Conteúdo

1	Introdução	1
2	Chumbo	3
2.1	<i>História</i>	3
2.2	<i>Exposição e Absorção do Chumbo</i>	4
2.2.1	<i>Interações no organismo</i>	5
2.3	<i>Patologias associadas ao chumbo</i>	7
3	Elementos Traço nos Tecidos	9
3.1	<i>Cancro do Pulmão</i>	11
3.2	<i>Cancro do Cólon</i>	11
3.3	<i>Cancro do Rim</i>	11
4	Pêlo	13
4.1	<i>Anatomia do Pêlo Humano</i>	13
4.1.1	<i>Folículo Piloso</i>	14
4.1.2	<i>Estrutura do Pêlo Humano</i>	14
4.2	<i>Cabelo Humano</i>	15
4.2.1	<i>Análise do Cabelo Humano</i>	16
4.2.2	<i>Semelhanças entre o pêlo do rato e Cabelo Humano</i>	16
5	Técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X	17
5.1	<i>Produção dos raios -x</i>	17
5.2	<i>Interação dos raios-x com a matéria</i>	18
5.2.1	<i>Absorção fotoelétrica e Dispersão</i>	18
5.3	<i>Reflexão e Refracção</i>	19
5.4	<i>Espectroscopia de Fluorescência de Raios-x</i>	20
5.4.1	<i>Micro - Espectroscopia de Fluorescência de Raios-x</i>	20
5.4.2	<i>Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia</i>	23
5.5	<i>Análise Quantitativa e Qualitativa</i>	25
5.5.1	<i>Análise em EDXRF</i>	25
5.5.2	<i>Análise em μ-XRF</i>	26

6	Materiais e Métodos	29
6.1	<i>Procedimento Experimental</i>	29
6.1.1	<i>Procedimento Experimental para a Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar</i>	29
6.1.2	<i>Procedimento Experimental para Tecido Cancerígenos</i>	34
6.2	<i>Análise Estatística</i>	35
7	Resultados e Conclusões	37
7.1	<i>Resultados</i>	37
7.1.1	<i>Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar</i>	37
7.1.2	<i>Tecido Cancerígenos</i>	46
7.2	<i>Conclusões</i>	49
7.2.1	<i>Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar</i>	49
7.2.2	<i>Tecido Cancerígenos</i>	50
8	Trabalho Futuro	51
A	Patologias Associadas à Intoxicação por Chumbo	57
B	Elementos Químicos Comuns no Organismo	59
C	Classificação do Pêlo dos Ratos Wistar	61
D	Danificação por Chumbo do Cabelo Humano	63
E	Consumo de chumbo pelos Ratos Wistar	65
F	Mepeamentos	67
F.1	<i>Mapeamento Dos Rins dos Ratos Wistar</i>	67
F.2	<i>Mapeamento das Unhas dos Ratos Wistar</i>	69
F.3	<i>Mapeamento dos Tecidos Cancerígenos</i>	71
F.3.1	<i>Pulmão</i>	71
F.3.2	<i>Rim</i>	72
F.3.3	<i>Cólon</i>	75
G	Dados dos Tecidos Cancerígenos	79
H	Análise de Dados dos Ratos Wistar	83

Lista de Figuras

2.1	Exposição do ser humano ao chumbo (Paninho, 2010)	5
2.2	Representação da biossíntese da heme onde estão representadas as enzimas inibidas pelo chumbo (Bradberry and Vale, 2007)	6
4.1	Anatomia do pêlo: a) Pêlo composto por haste e raiz; b) Secção transversal de um pêlo no interior do folículo (Rod R. Seeley, 2003)	14
4.2	a) Padrão da cutícula saudável desenvolvida de um folículo de cabelo humano (Bencze, 1990); b) Microscopia electrónica de varrimento de um cabelo com toxicação por antimónio Sb(Bencze, 1990)	16
5.1	Composição de um espectro de WRF: Cada pico de fluorescência apresenta a linha K ou L de um dado elemento. Estes picos são identificados através do eixo dos xx's que se apresenta-se em KeV. Associa-se um valor em KeV a um elemento, através das tabelas. O pico de energia zero não é originado na amostra mas sim criado através da electrónica e é utilizado essencialmente para controlo da electrónica e para calibração de energias. No eixo dos yy's apresentam-se as contagens por segundo (Nano, 2009a).	22
5.2	Esquema do tubo de Raios X (Guimaraes, 2007).	23
5.3	Montagem do EDXRF: (1)tubo de raios-x, (2) Alvo secundário de Molibdénio, (3) Amostra, (4) Detector de Si(Li) (Marguí et al.,).	24
5.4	Esquema demonstrativo da região de interesse.	25
6.1	Um dos rato wistar utilizado no estudo	30
6.2	Montagens dos pêlos dos ratos wistar com fita de carbono em caixas de petri.	31
6.3	Montagens dos pêlos dos ratos wistar com fita de carbono em slide.	32
6.4	Montagens dos rins dos ratos wistar com fita de carbono em slides com mylar.	32
6.5	Montagens das unhas dos ratos wistar contaminados em fita de carbono nas caixas de petri.	33
6.6	Esquema ilustrativo do mapeamento. Cada circulo representa um pixel.	34
6.7	Esquema ilustrativo das montagens dos tecidos cancerígenos utilizados no estudo	35

7.1	Dados da tabela 7.2. É de salientar que o eixo vertical à direita apresenta concentrações para os pêlos e o eixo vertical à esquerda apresenta intensidades para os rins e unhas.	38
7.2	Dados recolhidos do equipamento de EDXRF. a) Gráfico de barras com os dados do pêlo da barriga. b) Gráfico de barras com os dados do pêlo do dorso.	41
7.3	Dados recolhidos do equipamento de EDXRF. a) Gráfico de barras com os dados do pêlo da barriga. b) Gráfico de barras com os dados do pêlo do dorso.	42
7.4	Gráfico de barras com a intensidade dos elementos enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), zinco (Zn) e chumbo (Pb) nos ratos 4 e 7.	44
7.5	Gráfico de barras com a intensidade do cálcio (Ca) e do chumbo (Pb) nos ratos 4 e 7.	44
7.6	Gráfico de barras com a concentração de todos os elementos encontrados nos pêlos do dorso dos ratos 4 e 7.	45
7.7	Gráfico de barras com a concentração de todos os elementos encontrados nos pêlos da barriga dos ratos 4 e 7.	46
7.8	Dados recolhidos do equipamento de μ -XRF. a) Dados recolhidos utilizando o equipamento sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos utilizando o equipamento com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.	47
7.9	Médias dos valores das intensidades do elementos das amostra saudáveis e das amostras com neoplasia. a) Dados sem filtro. b) Dados com filtro. . .	47
7.10	Dados recolhidos das amostras de tecido do cólon no equipamento de μ -XRF. a) Dados recolhidos no equipamento sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos no equipamento com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.	48
7.11	Valores médios para a amostra com neoplasia e para a amostra saudável. a) Médias sem qualquer tipo de filtro. b) Médias com o maior filtro.	48
7.12	Dados recolhidos das amostras de tecido do pulmão. a) Dados recolhidos no μ -XRF sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos no μ -XRF com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.	49
C.1	Fotografia obtida por SEM da estrutura do pêlo do rato Wistar (Voges et al., 2012)	61
C.2	Na figura a) apresenta-se a estrutura da medula do pêlo do rato wistar. Enquanto que na figura b) se apresenta um corte transversal no pêlo do rato (Voges et al., 2012)	61
D.1	Micróscoopia electrónica de varrimento de um cabelo que está toxicado com chumbo(Bencze, 1990)	63

F.1	Rins dos ratos Wistar utilizados neste experimento. a) rim do rato 1 (Pb1), b) rim do rato 2 (Pb2), c) rim do rato 3 (Pb3), d) rim do rato 4 (Pb4), e) rim do rato 5 (Pb5), f) rim do rato 6 (Pb6), g) rim do rato 7 (Pb7), h) rim do rato 8 (Pb8), i) rim do rato 9 (Pb9), j) rim do rato 10 (Pb10).	67
F.2	Mapeamentos do Chumbo de todos os rins dos ratos. Este mapeamento funciona com intensidades de cor, quando a cor é mais intensa implica uma maior concentração do elemento.	67
F.3	Mapeamentos do Chumbo de todos os rins dos ratos com contraste. Este mapeamento tem uma gama de cores, onde a cor mais clara, neste caso o branco, apresenta uma maior concentração do elemento e o vermelho uma menor concentração do elemento.	68
F.4	Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 6	68
F.5	Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 7	68
F.6	Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 10	69
F.7	Unhas dos ratos Wistar utilizados neste experimento. a) unha do rato 1 (Pb1), b) unha do rato 2 (Pb2), c) unha do rato 3 (Pb3), d) unha do rato 4 (Pb4), e) unha do rato 5 (Pb5), f) unha do rato 6 (Pb6), g) unha do rato 7 (Pb7), h) unha do rato 8 (Pb8), i) unha do rato 9 (Pb9), j) unha do rato 10 (Pb10).	69
F.8	Mapeamentos do Chumbo de todas as unhas dos ratos. Este mapeamento funciona com intensidades de cor, quando a cor é mais intensa implica uma maior concentração do elemento.	69
F.9	Mapeamentos do Chumbo de todas as unhas dos ratos com contraste. Este mapeamento tem uma gama de cores, onde a cor mais clara, neste caso o branco, apresenta uma maior concentração do elemento e o vermelho uma menor concentração do elemento.	70
F.10	Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 2	70
F.11	Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 4	70
F.12	Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 10	71
F.13	Mapeamento da Amostra do Pulmão Saudável	71
F.14	Mapeamento da Amostra do Pulmão Saudável com Contraste	71
F.15	Mapeamento da Amostra do Pulmão com Neoplasia	72
F.16	Mapeamento da Amostra do Pulmão com Neoplasia com Contraste	72
F.17	Mapeamento da Amostra 1 de Rim Saudável	72
F.18	Mapeamento da Amostra 1 de Rim Saudável com Contraste	73
F.19	Mapeamento da Amostra 1 de Rim com Neoplasia	73
F.20	Mapeamento da Amostra 1 de Rim com Neoplasia com Contraste	73
F.21	Mapeamento da Amostra 2 de Rim Saudável	74
F.22	Mapeamento da Amostra 2 de Rim Saudável com Contraste	74
F.23	Mapeamento da Amostra 2 de Rim com Neoplasia	74
F.24	Mapeamento da Amostra 2 de Rim com Neoplasia com Contraste	75

F.25	Mapeamento da Amostra 1 de Cólon Saudável	75
F.26	Mapeamento da Amostra 1 de Cólon Saudável com Contraste	75
F.27	Mapeamento da Amostra 1 do Cólon com Neoplasia	76
F.28	Mapeamento da Amostra 1 do Cólon com Neoplasia com Contraste	76
F.29	Mapeamento da Amostra 2 de Cólon Saudável	76
F.30	Mapeamento da Amostra 2 de Cólon Saudável com Contraste	77
F.31	Mapeamento da Amostra 2 de Cólon com Neoplasia	77
F.32	Mapeamento da Amostra 2 de Cólon com Neoplasia com Contraste	77
H.1	Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos rins de cada rato em função das suas concentrações.	87
H.2	Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nas unhas de cada rato em função das suas concentrações.	88
H.3	Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos pêlos do dorso de cada rato wistar.	89
H.4	Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos pêlos da barriga de cada rato wistar.	90
H.5	Espectro retirado do equipamento de micro-fluorescência de raios-X. Este espectro representa a medição feita neste equipamento ao pêlo do dorso do Rato 4.	93
H.6	Espectro retirado do equipamento de EDXRF. Este espectro representa a medição feita neste equipamento ao pêlo do dorso do Rato 4.	93

Lista de Tabelas

7.1	Valores de Chumbo (Pb) para os Ratos Wistar. Os dados do rim e da unha foram recolhidos com a técnica μ -XRF enquanto que os dos pêlos foram recolhidos com a técnica EDXRF.	38
7.2	Concentrações de chumbo (Pb) nos Ratos Wistar após ter sido considerada uma linha de base.	39
7.3	Correlação de Spearman entre o rim e os pêlos da barriga	39
7.4	Correlação de Spearman entre o rim e os pêlos do dorso.	39
7.5	Correlação de Spearman entre o rim e a unha.	40
7.6	Correlação de Spearman entre os pêlos do dorso e a unha.	40
7.7	Correlação de Spearman entre os pêlos do dorso e os pêlos da barriga. . .	40
7.8	Correlação de Spearman entre os pêlos da barriga e a unha.	40
7.9	Correlação de Spearman para os pêlos da barriga.	41
7.10	Correlação de Spearman para os pêlos do dorso.	42
7.11	Correlação de Spearman para os pêlos da barriga.	42
7.12	Correlação de Spearman para os pêlos do dorso.	43
7.13	Teste U-Mann Whitney para o elemento Zn dos pêlos do dorso.	45
A.1	Tabela de Patologias associadas à intoxicação por Chumbo	58
B.1	Elementos Químicos Comuns no Organismo. Esta tabela contém os elementos mais importantes encontrados no organismo e as suas concentrações.	59
E.1	Características dos Ratos Wistar	66
G.1	Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de rim.	79
G.2	Valores de intensidades médias para as amostras dos tecidos de rim. . . .	79
G.3	Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de Cólon.	80
G.4	Valores de intensidades médias para as amostras dos tecidos de cólon. . .	80
G.5	Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de pulmão.	80
G.6	Valores de intensidades para as amostras com neoplasia dos tecidos de pulmão, rim e cólon.	81
G.7	Valores de intensidades para as amostras saudáveis dos tecidos de pulmão, rim e cólon.	81

H.1	Teste U-Mann Whitney para o rim.	83
H.2	Teste U-Mann Whitney para a unha.	83
H.3	Teste U-Mann Whitney para os pêlos do dorso.	84
H.4	Teste U-Mann Whitney para os pêlos da barriga	84
H.5	Dados da primeira e última recolha de pêlos da Barriga do rato 4 (rato contaminado)	84
H.6	Dados da primeira e última recolha de pêlos do dorso do rato 4 (rato contaminado)	84
H.7	Dados da primeira e última recolha de pêlos da Barriga do rato 7 (rato contaminado)	85
H.8	Dados da primeira e última recolha de pêlos do dorso do rato 7(rato contaminado)	85
H.9	Teste U-Mann Whitney para o elemento S dos rins.	85
H.10	Teste U-Mann Whitney para o elemento K dos rins.	85
H.11	Teste U-Mann Whitney para o elemento Ca dos rins.	85
H.12	Teste U-Mann Whitney para o elemento Zn dos rins.	86
H.13	Tabela com todos os valores de intensidade dos elementos analisados anteriormente para cada rato.	91
H.14	Tabela com os valores de intensidade de Ca e Pb para cada rato.	91
H.15	Tabela com os valores de concentração de todos os elementos dos pêlos do dorso.	91
H.16	Tabela com os valores de concentração de todos os elementos dos pêlos da barriga.	92

Capítulo 1

Introdução

Elementos traço são elementos que existem no organismo (Magalhães et al., 2010) e cuja concentração é inferior a 0,1% (ou inferior a 1000 ppm) (Jenner, 1996). Os elementos traço estão, nomeadamente, em concentrações estáveis no organismo. No entanto, um aumento destas concentrações pode provocar intoxicações no organismo humano (Bradberry and Vale, 2003).

Existem muitos investigadores que tentam correlacionar estes elementos traço com o cancro e apesar de ser difícil determinar os efeitos prováveis destes elementos no aparecimento ou desenvolvimento dos tecidos cancerígenos, consegue verificar-se uma correlação entre as variações das concentrações destes elementos (leves e pesados), em os tecidos saudáveis e cancerígenos (Magalhães et al., 2010).

O chumbo (Pb) é um elemento traço que existe na crosta terrestre (Cheng and Hu, 2010) e é um dos maiores poluentes ambientais (Sabbar et al., 2012), sendo tóxico para a saúde pública (Guimaraes, 2010). O sistema nervoso (Winneke, 2011), os rins e os eritrócitos são pontos de ataque deste metal no organismo (Philip J. Landrigan, 1994). Este metal é electropositivo, tendo alta afinidade para cargas negativas como é o caso dos grupos sulfídricos do organismo afectando os sistemas enzimáticos dependentes de zinco (Bradberry and Vale, 2003).

Várias organizações (Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência de Protecção Ambiental (EPA), Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças (ATSDR) desenvolveram regulamentos onde contam valores limite para as concentrações de chumbo, tanto no ar, como no solo e na água (Guimaraes, 2010). No entanto, o problema de intoxicação por chumbo ainda é um problema actual e o debate sobre o valor de concentração a partir do qual o chumbo é prejudicial para a saúde pública ainda está em aberto (Guimaraes, 2010). Os casos mais graves de intoxicação afectam essencialmente o sistema nervoso (Moreira, 2004), mas a patologia mais comum é a encefalopatia (Bradberry and Vale, 2003) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

O pêlo é uma característica comum a todos os mamíferos (Rod R. Seeley, 2003). No entanto, características específicas dos pêlos, tais como a taxa de crescimento, a cor, a

estrutura interna (Lee et al., 2011), mudam entre diferentes espécies ou até mesmo subespécies e diferentes raças (Chernova, 2002).

Pelo facto de a análise do cabelo humano ser um método de detecção não-invasivo (Filistowicz et al., 2011), e não-complexo (Dirce Pozebon, 1999), a procura de elementos traço no cabelo tem sido objecto de várias áreas de estudo, nomeadamente na biomedicina e nas ciências ambientais, pois o cabelo pode ser um bioindicador visto que, em princípio, existe uma relação entre concentração de elementos traço que se pode encontrar neste e que se pode encontrar nos restantes órgãos (Khudzari et al., 2013).

Neste trabalho efectuam-se em dois estudos, que apesar de terem objectivos diferentes, tem uma finalidade comum: contribuir para um meio de diagnóstico alternativo de intoxicação por elementos traço em humanos.

No primeiro estudo procedeu-se à intoxicação de ratos através da água com a finalidade de determinar as concentrações de elementos traço, dando especial ênfase ao chumbo, no pêlo e em alguns tecidos dos ratos Wistar, nomeadamente, o rim e as unhas. Pretendeu-se determinar a evolução do chumbo ao longo do pêlo do rato Wistar de modo a contribuir para um conhecimento que posteriormente possa correlacionar a concentração de diferentes elementos traço em diferentes tecidos biológicos com as respectivas concentrações no pêlo. No segundo trabalho, analisaram-se tecidos cancerígenos e tecidos saudáveis de modo a determinar a relação entre a quantidade de elementos traço em tecidos com a neoplasia e em tecidos saudáveis.

A análise elementar destes dois estudos foi efectuada utilizando a técnica de espectroscopia de raios-X. As concentrações nos pêlos dos ratos e nos tecidos foi determinada utilizando a μ -fluorescência de raios - X (μ - XRF) e a fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF), em que a primeira permite efectuar uma análise pontual de material não homogéneo (Nano, 2009b), enquanto que a segunda é uma ferramenta rápida para a análise elementar de certas amostras homogéneas (Gonzalez-Fernandez et al., 2007).

Esta dissertação está dividida em oito capítulos, no capítulo I efectua-se uma breve introdução sobre aspectos gerais e objectivos principais do trabalho e no capítulo II são descritos os elementos traço dando particular atenção ao chumbo visto este ser um elemento específico de um dos experimentos. É efectuada uma breve descrição dos tecidos cancerígenos, e do cabelo humano e pêlo dos ratos Wistar nos capítulos III e IV, respectivamente. O capítulo V é dedicado à descrição da técnica utilizada na determinação de concentrações de chumbo nos pêlos e nos tecidos dos ratos Wistar e nos tecidos humanos. A descrição do procedimento experimental, onde se inclui a recolha e tratamento de amostras e montagens experimentais é efectuada no capítulo VI. Finalmente, os resultados e conclusões são apresentados no capítulo VII e no capítulo VIII são apresentadas propostas futuras de acordo com o seguimento deste trabalho. É de salientar que estes dois estudos deram origem a dois artigos que irão ser brevemente publicados.

Capítulo 2

Chumbo

Os elementos que são considerados elementos traço são elementos cuja concentração é inferior a 0,1% ou inferior a 1000 ppm (Jenner, 1996). Estes podem acumular-se no corpo humano, nomeadamente em tecidos moles onde chegam através de inalação, ingestão ou mesmo por absorção pela pele (Khudzari et al., 2013). Estes elementos também se encontram no cabelo humano mas não apresentam concentrações fixas, visto que a sua concentração depende de outros factores como a dieta, as doenças e a genética (Dunnett and Lees, 2003).

É sabido que existe um atraso entre a absorção do elemento pelo corpo e a sua detecção no cabelo (Bencze, 1990), e acredita-se que existem tantas respostas biológicas quanto o número de actividades biológicas, uma vez que a sensibilidade dos sistemas enzimáticos a estes elementos é elevada (Moreira, 2004).

Neste trabalho deu-se especial importância ao chumbo como elementos traço visto este ser um dos maiores poluentes no ambiente (Sabbar et al., 2012) e bastante tóxico para o organismo humano (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). As intoxicações por este elemento resultam, por vezes, de longas exposições tóxicas. No entanto, acumulações por pequenas exposições também pode causar intoxicações (Bradberry and Vale, 2003).

O chumbo (*Plumbum*) de símbolo químico Pb é um constituinte na terrestre, isolado ou combinado com outros elementos, tais como PbS, PbCO₃ e PbSO₄ (Guimaraes, 2010).

2.1 História

O chumbo é um constituinte do ambiente humano há 5000 anos. A sua utilização deve-se à sua versatilidade, ductilidade, maleabilidade e baixo ponto de fusão. No entanto, este elemento é bastante tóxico para a saúde pública, sendo um dos maiores poluentes ambientais (Sabbar et al., 2012) e não sendo biodegradável. Pode ser encontrado em depósitos minerais libertado por causas naturais ou pela mão do homem através da sua actividade industrial (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). Muitos pintores, por exemplo Van Gogh (século 19), morreram devido a intoxicações por este metal. O chumbo era muito utilizado pelos romanos e gregos para utensílios de cozinha e mercadorias (Guimaraes,

2010). Uma das maiores conquistas humanas, do ponto de vista ambiental, foi a abolição da gasolina com chumbo em 1990. Muitos envenenamentos através da pele podem ter ocorrido aquando do desenvolvimento dos aditivos para a gasolina (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

Hoje em dia o chumbo é utilizado no fabrico de baterias, soldas, armas de fogo, borrachas e plásticos e serve como barreira de protecção contra a radiação (Bradberry and Vale, 2003).

2.2 Exposição e Absorção do Chumbo

Todas as classes sociais têm sido afectadas pela acção tóxica do chumbo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). A sua absorção no organismo depende de factores tais como a nutrição e a idade (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). É importante distinguir, esta intoxicação, entre adultos e crianças, visto que a susceptibilidade das crianças é maior do que a dos adultos (Moreira, 2004) afectando o seu desenvolvimento (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

O contacto das crianças com o chumbo pode dar-se devido ao meio envolvente (Philip J. Landrigan, 1994) e muitas vezes também devido ao trabalho dos pais em fábricas de chumbo (Philip J. Landrigan, 1994). Estes trabalhadores de fábricas apresentam maiores riscos de contágio através da inalação, nomeadamente aquando da combustão do chumbo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

Estes trabalhadores apresentam, por vezes, deficiências funcionais no sistema nervoso devido ao seu tempo de exposição. Também podem ser observadas alterações no nervo óptico e no sistema auditivo (Moreira, 2004).

A entrada de chumbo no organismo pode ocorrer através de ingestão ou por inalação, sendo a inalação a sua via predominante (cerca de 80%) (Bradberry and Vale, 2003) (Moreira, 2004) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

A contaminação aérea por chumbo pode resultar de tintas de edifícios e pontes, das emissões dos escapes dos automóveis e de descargas industriais. A contaminação na água ocorre devido à passagem desta por soldas ou canos cuja sua composição tem chumbo (Philip J. Landrigan, 1994) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005) ou pela utilização de fertilizantes nas culturas (Guimaraes, 2010). Outra forma de entrada de chumbo no organismo é o tabagismo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

Na figura 2.1 estão representadas as possibilidades conhecidas e documentadas de contaminação que o homem pode sofrer.

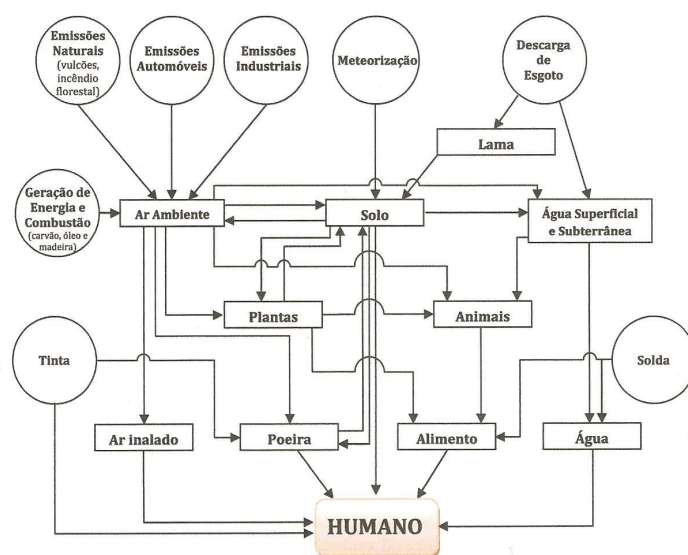


Figura 2.1: Exposição do ser humano ao chumbo (Paninho, 2010)

2.2.1 Interações no organismo

O chumbo entra na corrente sanguínea onde, para além de se acumular nos eritrócitos (Bradberry and Vale, 2003), é transportado através do organismo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). Só cerca de 1% do chumbo é que se mantém no sangue e deste (Philip J. Landrigan, 1994) cerca de 99% encontra-se nos eritrócitos e 1 % encontra-se no plasma e sêrum (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). A concentração de chumbo no plasma é a mais importante porque é através deste que é espalhado pelo corpo e alcança os órgãos alvo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). É também de salientar que a passagem do chumbo do sangue para os tecidos moles é relativamente lenta pois requer cerca de 4 a 6 semanas (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

As maiores concentrações de chumbo no organismo encontram-se nos ossos (mais de 90% (Nikolas C. Papanikolaou, 2005)), no sistema nervoso e nos rins (Moreira, 2004) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005) onde produz efeitos tóxicos. Salienta-se que o chumbo também interage toxicamente com o fígado e com o sistema hematopoético (Othman and El Missiry, 1998). Os rins e o fígado são órgãos que entram no metabolismo de substâncias tóxicas e de desintoxicação e podem sofrer danos devido às reacções oxidativas do chumbo (Guimaraes, 2010).

O sistema nervoso é aquele que apresenta mais sensível à toxicidade do chumbo (Moreira, 2004) , sendo este o primeiro ponto de ataque, provocando bastantes mudanças no sistema neurológico (Sabbar et al., 2012) e maiores riscos para o comportamento humano (Winneke, 2011).

O chumbo é um metal electropositivo tendo, por isso, muita afinidade para cargas negativas (Bradberry and Vale, 2003). Consequentemente interage com grupos funcionais tais como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{SH}$ levando, posteriormente, à inibição de funções enzimáticas de moléculas importantes (Bradberry and Vale, 2003) (Bradberry and Vale, 2007)

(Moreira, 2004) (Philip J. Landrigan, 1994) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). A interacção que leva a efeitos bastante tóxicos é a interacção com $-SH$ (Moreira, 2004).

Os três efeitos mais importantes encontrados pela acção do chumbo no organismo são na biossíntese da heme, no sistema nervoso e no sistema urinário (Philip J. Landrigan, 1994) (Winneke, 2011) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

O chumbo tende a substituir iões bivalentes que interagem quimicamente em membranas celulares e em organelos intracelulares (Bradberry and Vale, 2007). Nomeadamente, este consegue inibir e imitar a acção do cálcio interagindo com proteínas (Moreira, 2004) (Othman and El Missiry, 1998). O chumbo também inibe a produção de Hemoglobina (Hb), ligando-se a esta e afectando reacções enzimáticas importantes na síntese da heme, como está descrito na figura 2.2. Por outro lado, a produção de vitamina D pode ser afectada pela dieta, pelas necessidades de cálcio e de fósforo e também pela presença de chumbo, visto existirem estudos que concluem que a interferência do chumbo na produção da heme pode ser a base para os efeitos no metabolismo da vitamina D (Moreira, 2004).

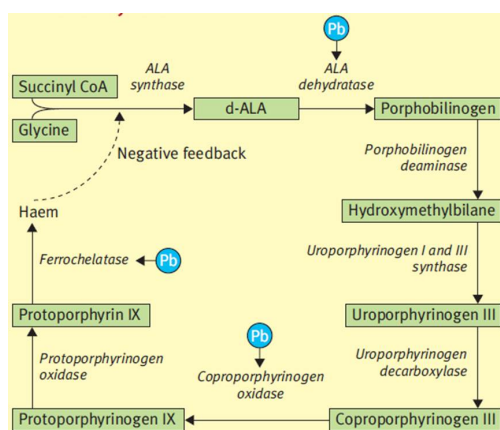


Figura 2.2: Representação da biossíntese da heme onde estão representadas as enzimas inibidas pelo chumbo (Bradberry and Vale, 2007)

No organismo, a incorporação de chumbo afecta também o sistema gastrointestinal, o sistema reprodutivo (Moreira, 2004) e órgãos tais como o fígado e os rins (Othman and El Missiry, 1998).

Apesar do chumbo se acumular em várias partes do organismo, este também é expelido por várias vias apesar de ser de forma lenta (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). A excreção efectua-se pelos rins (cerca de 75%), pela biliar, por secreções gastrointestinais, pelo cabelo, pelas unhas e pelo suor (Bradberry and Vale, 2003) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). A quantidade de chumbo que se encontra no organismo é a diferença entre a quantidade que foi absorvida durante a vida e a que foi expulsa (Philip J. Landrigan, 1994).

O chumbo permanece no sangue cerca de 35 dias, nos tecidos moles cerca de 40 dias e nos ossos cerca de 20 a 30 anos, apresentando um efeito cumulativo nestes. Assim,

conseguimos concluir que o sangue não é o melhor bio marcador para a exposição crónica do chumbo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

2.3 *Patologias associadas ao chumbo*

A intoxicação por chumbo no organismo humano é denominada por Saturnismo (Guimaraes, 2010).

Quando estes efeitos de toxicidade ocorrem em crianças, os efeitos podem tornar-se permanentes tais como um défice no QI e deficiências cognitivas (Moreira, 2004) (Philip J. Landrigan, 1994) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). Estes efeitos, podem aparecer em crianças para valores menores que 10 μg por dl de sangue e em adultos para concentrações de 40 μg por dl de sangue (Moreira, 2004).

A patologia mais associada à intoxicação por chumbo é a encefalopatia (Moreira, 2004) que provém de mudanças no sistema neurológico (Sabbar et al., 2012) e cujos sintomas podem passar por dores de cabeça, falta de atenção, irritação, perda de memória e a falta de interesse (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

Outra patologia associada ao chumbo é a anemia que resulta da acção do chumbo sobre o tempo de vida dos eritrócitos e sobre a síntese da hemoglobina (Moreira, 2004). No entanto, esta apenas pode ser considerada como tal se a concentração de Pb-S se mantiver elevada durante um período de tempo (Moreira, 2004).

A intoxicação por chumbo também está associada a abortos (Moreira, 2004) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005) e está documentado que a fertilidade é reduzida pela intoxicação deste elemento para níveis de Pb-S entre 27 μg por dl de sangue e 60 μg por dl de sangue (Moreira, 2004).

O chumbo também se apresenta como um potencial carcinogénico renal visto que ao substituir o zinco em proteínas que auxiliam a transcrição provoca uma redução nas ligações com elementos de identificação de DNA genómico surgindo uma alteração genética (Moreira, 2004).

O chumbo inibe vários factores tais como o peso, os movimentos horizontais normais e espontâneos, os movimentos de elevação, os movimentos verticais, a redução da actividade locomotora (Sabbar et al., 2012) e o crescimento. Sendo este também associado a doenças renais como é o exemplo da nefropatia (Moreira, 2004) (Philip J. Landrigan, 1994) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). Outras doenças e patologias associadas ao chumbo encontram-se tabeladas em anexo (Apêndice A).

O bio marcador utilizado hoje em dia para o chumbo são as suas concentrações no sangue, como se viu anteriormente este controlo é difícil este controlo devido ao relativo pouco tempo que o chumbo permanece no sangue e, para além disso, devido às suas concentrações serem reduzidas tornando difícil esta análise (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). No entanto, nos ossos aparecem linhas de chumbo cuja largura depende da concentração do chumbo existente no organismo. Realça-se que este método não é sensível ao diagnóstico de envenenamento por chumbo (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

Os limites de exposição do chumbo foram sendo alterados ao longo dos anos e actualmente encontram-se nos 20 μg por dl de sangue. No entanto, para crianças já se considera que 10 μg por dl de sangue é um nível elevado ([Nikolas C. Papanikolaou, 2005](#)).

Capítulo 3

Elementos Traço nos Tecidos

Os avanços na prevenção e no tratamento têm evoluído ao longo dos anos e têm sido eficazes na redução de mortalidade por certas doenças, por exemplo, por doenças cardiovasculares. No entanto, tem havido menos sucesso quando se trata de baixar a mortalidade em relação à morte por cancro (Danaei et al., 2005).

Apesar da combinação de rastreio e tratamento de alguns cancros ser cada vez mais eficaz na redução da morte por estes, existem ainda muitos tipos de cancros que ainda não se conseguiu diminuir a mortalidade (Danaei et al., 2005).

Mais do que um em cada três das sete milhões de mortes por cancro em todo o mundo é causada por factores de risco tais como o tabagismo e o abuso de álcool (Danaei et al., 2005).

A pesquisa biomédica e o desenvolvimento da tecnologia têm produzido rastreios eficazes contra certos cancros, como por exemplo a mamografia para o cancro da mama. No entanto, a tecnologia ainda não se mostrou tão promissora no que diz respeito a outros cancros tais como o cancro do pulmão (Danaei et al., 2005).

Os tecidos do sistema biológico são constituídos por uma matriz representada por elementos leves entre os quais se encontram o H, o C, o S e o N (Magalhães et al., 2006). No entanto, também os elementos traço fazem parte dos sistemas biológicos tendo por isso um papel importante nas várias funções das células (Carvalho et al., 2007) (Magalhães et al., 2006) e, sob condições normais, estes elementos encontram-se em equilíbrio no que se refere às distribuições de densidade nos tecidos (Magalhães et al., 2006). No apêndice B encontra-se uma tabela dos elementos presentes no organismo humano.

Um dos principais processos do organismo é a divisão celular. Este é um mecanismo de controlo rigoroso imposto pelos mecanismos de regulação do organismo. No entanto, algumas células deixam de responder aos sinais enviados por este mecanismo para parar a sua produção. Estas células são as chamadas células cancerígenas que o sistema imunitário normalmente destrói. De alguma forma, existem algumas destas células que escapam a este mecanismo de defesa, continuam a sua produção e começam, então, a originar um tumor (Magalhães et al., 2010).

Nem todos os tumores originados no organismo são malignos, mas todos eles são

cancerosos. Os tumores malignos infiltram-se e formam metástases noutros tecidos e órgãos (Magalhães et al., 2010).

Ao longo dos anos, têm sido investigados tecidos cancerígenos e tecidos saudáveis de forma a criar uma correlação entre estes e a obter um possível mecanismo de diagnóstico (Magalhães et al., 2006). Muitos investigadores tentam encontrar esta correlação de modo a poder melhorar a prevenção do cancro (Magalhães et al., 2006).

Em estudos prévios, foram efectuadas electromiografias a tecidos cancerígenos, observando-se que estes têm tendência a captar certas partículas magnéticas para as células cancerígenas (Gordon, 1978). No entanto, os elementos traços têm papéis importantes na actividade biológica do organismo humano, nomeadamente em funções reguladoras (Ide-Ektesabi et al., 2002), sendo o seu estudo e o estudo das suas concentrações uma informação valiosa para a ciência biomédica (Yuying et al., 2001).

Entre os elementos traço existentes no organismo destacam-se o selénio (Se), o zinco (Zn) e o cobre (Cu) (Piccinini et al., 1996).

O selénio é um elemento encontrado no organismo humano e essencial a este mas também poderá ter efeitos tóxicos quando se acumula em grandes quantidades (Majewska et al., 2007). No entanto, o selénio tem-se mostrado um inibidor sobre o vírus cancerígeno (Piccinini et al., 1996) (Majewska et al., 2007) (Schrauzer, 2000) (Kubala-Kukus et al.,). Sendo que quando encontrado com concentração mais elevada poderá indicar a resposta ao organismo no combate à doença (Majewska et al., 2007).

O zinco é um elemento essencial para o crescimento dos tecidos apresentando assim uma acção protectora no crescimento de ambos os tecidos (saudáveis e cancerígenos) (Piccinini et al., 1996) (Majewska et al., 2007). Em estudos anteriores foram encontradas quantidades significativas de zinco em tecido cancerígeno sendo que este elemento é associado à promoção do crescimento destes tecidos (Majewska et al., 2007) (Schrauzer, 2000). No entanto, foi observada uma diminuição de Zn que poderá estar relacionada com inibições das funções de elementos essenciais, alteração do metabolismo e alteração da função das proteínas no transporte e na manutenção de elementos essenciais (Magalhães et al., 2006).

O cobre desempenha um papel em reacções bioquímicas do organismo humano, sendo um co-factor de enzima que impede o início e a progressão de tumores através da protecção de células contra substâncias que provocam a formação de radicais livres (Majewska et al., 2007).

O ferro por ser um elemento essencial nas funções fisiologias do organismo humano desempenhando funções na regulação e diferenciação celular, influencia também o processo da carcinogénese (Majewska et al., 2007). Este é um elemento de elevada dispersão podendo isto significar que a quantidade de sangue que se encontra em cada tecido é diferente (Magalhães et al., 2006). Vários estudos demonstraram que o ferro poderá também desempenhar um papel na malignidade visto que o ferro pode catalisar a produção de radicais de oxigénio que por sua vez podem ser cancerígenos (Majewska et al., 2007).

É importante também salientar que o zinco e o cálcio são elementos que foram detectados tanto em tecidos cancerígenos como em tecidos normais (Ide-Ektessabi et al., 2002).

3.1 *Cancro do Pulmão*

O cancro do pulmão é responsável por mais de 7% de todas as mortes em ambos os sexos e a incidência deste cancro está a aumentar em mulheres (Carvalho et al., 2007). Para o desenvolvimento desta doença temos como factores de risco o tabagismo, a profissão, o meio ambiente, as bronquites crónicas e as cicatrizes nos pulmões (Carvalho et al., 2007).

Magalhães et al. mostrou ao analisar o tecido cancerígeno pulmonar que os elementos importantes são o ferro (Fe), o cobre (Cu), o zinco (Zn) e o selénio (Se) por estes apresentarem maiores concentrações nestes tecidos malignos. Para o bromo (Br) acontece o oposto neste estudo, ou seja, este diminui em amostra malignas (Carvalho et al., 2007).

Noutros estudos de tecido cancerígeno do pulmão, também foi concluído que o cobre tinha uma concentração mais elevada nestes tecidos do que em tecido saudável sendo que o selénio e o zinco encontrados neste tecido tinham concentrações menores em tecidos cancerígenos do que em saudáveis (Majewska et al., 2007).

3.2 *Cancro do Cólon*

Em amostras do tecido do colon os valores de cálcio (Ca), zinco (Zn) e estrôncio (Sr) são semelhantes em tecidos saudáveis e cancerígenos ao contrário do fósforo (P), potássio (K), cobre (Cu) e níquel (Ni) que aumentam em tecido com cancro. Elementos tais como o iodo (I) e o bromo (Br) são elementos cujas concentrações diminuem em tecidos cancerígenos (Magalhães et al., 2006).

Diferentes estudos sobre o cancro do intestino indicam uma correlação deste com o sistema de nutrição. A incidência do cancro do intestino em países desenvolvidos é cerca de vinte vezes maior do que em países em desenvolvimento (Magalhães et al., 2010).

Neste cancro encontra-se um baixo valor para o selénio (Se), mas considera-se que este é uma consequência da doença e não uma razão para o seu desenvolvimento (Magalhães et al., 2010). Pacientes com doenças gastrointestinais também apresentam uma deficiência em Se isto pode significar uma relação entre a nutrição e os níveis de Se (Magalhães et al., 2010).

3.3 *Cancro do Rim*

O cancro de rim representa cerca de 2 a 4% de todos os cancros nos países desenvolvidos sendo que as taxas de incidência são maiores em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento (Prithwish et al., 2014).

Entre os factores de risco que podem influenciar este tipo de cancro encontram-se o tabagismo, a obesidade e a hipertensão (Prithwish et al., 2014).

Amostras de tumores de rim foram analisadas por fluorescência de raios-x por Ebraheem et al. e elementos, tais como, ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e potássio (K) foram encontrados. Este estudo provou que a concentração de Zn diminui nestes tecidos enquanto que as concentrações de Fe, Cu e K aumentam (Al-Ebraheem et al., 2009).

O cádmio (Cd) também apresenta concentrações mais elevadas em tecidos cancerígenos renais tanto para pacientes do sexo masculino como para pacientes do sexo feminino (Schrauzer, 2000) (Bhuloka Reddy et al., 2004) Reddy et al. encontrou valores elevados nas concentrações de Cr e Ni para tecidos cancerígenos de rim (Bhuloka Reddy et al., 2004).

Capítulo 4

Pêlo

O pêlo é uma característica comum a todos os mamíferos (Rod R. Seeley, 2003). No entanto, características específicas dos pêlos, tais como a taxa de crescimento, a cor e a estrutura interna (Lee et al., 2011), variam entre diferentes espécies ou até mesmo subespécies e diferentes raças (Chernova, 2002), entre animais e humanos (Lee et al., 2011).

4.1 *Anatomia do Pêlo Humano*

O pêlo situa-se praticamente em toda a parte do corpo humano, exceptuando as palmas das mãos, as plantas dos pés, os lábios, os mamilos, os segmentos distais dos dedos das mãos e dos pés e os órgãos genitais externos.

O pêlo divide-se em duas partes: uma haste e uma raiz. A haste é a parte acima da superfície da pele e representa a parte visível do pêlo enquanto que a raiz é a parte abaixo da superfície da pele. A haste é constituída por três componentes distintos: a medula (parte mais interna do pêlo), o córtex (parte central) e a cutícula (parte exterior do pêlo, é esta a parte que se visualiza do pêlo)(Rod R. Seeley, 2003) (Dunnett and Lees, 2003) (Dirce Pozebon, 1999). A raiz do pêlo, para além de conter no interior os mesmos componentes que a haste, contém também, um folículo piloso que reveste a cutícula (Rod R. Seeley, 2003). Ligados ao folículo existem glândulas sudoríparas apócrifas e glândulas sebáceas (das quais resulta um "cebo" que reveste o cabelo e a pele, repele a água e providência uma barreira física) (Dunnett and Lees, 2003). O folículo, por sua vez, contém uma papila dérmica, onde se procede à alimentação das células da raiz e a regulação do crescimento do cabelo (Dunnett and Lees, 2003) (Rod R. Seeley, 2003) e uma matriz que representa a zona de crescimento do cabelo (Rod R. Seeley, 2003). O desenvolvimento e crescimento do pêlo ocorre no folículo (Dirce Pozebon, 1999). Esta descrição pode ser observada na figura 4.1.

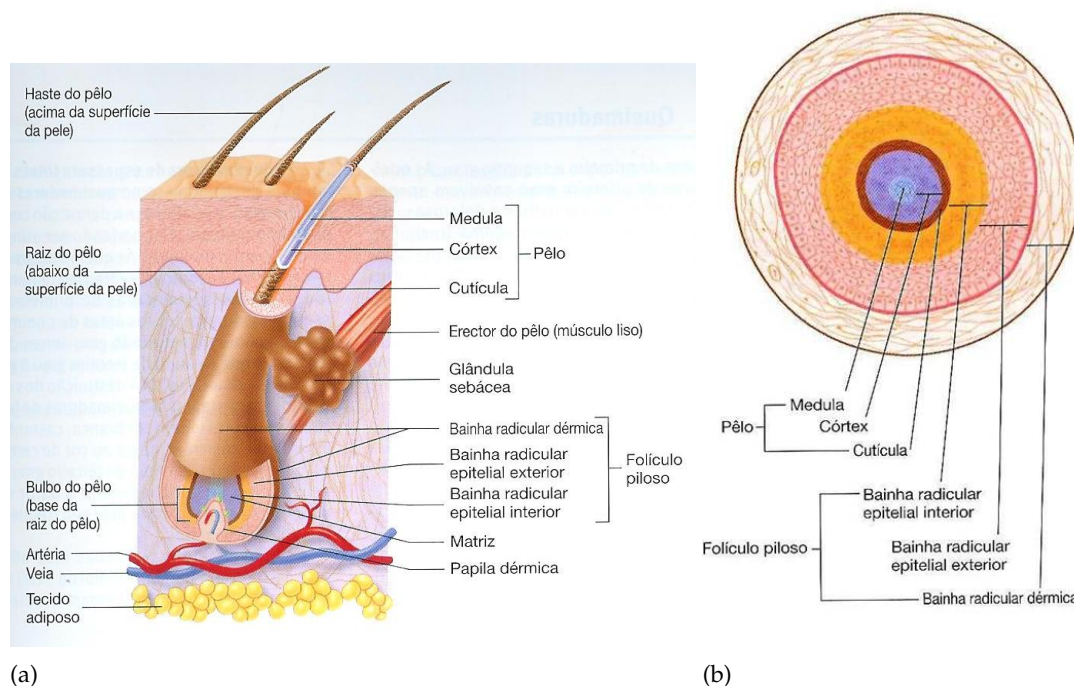


Figura 4.1: Anatomia do pêlo: a) Pêlo composto por haste e raiz; b) Secção tranversal de um pêlo no interior do folículo (Rod R. Seeley, 2003)

4.1.1 Folículo Piloso

O folículo piloso é um dos componentes com bastante interesse em estudos de desenvolvimento de tecidos, diferenciação celular e formação de tumores. (Ben-Ari, 2000). Este estende-se desde a derme até a epiderme através do extracto córneo (Dirce Pozebon, 1999) e começa a desenvolver-se num determinado sítio do corpo, expandindo-se para o resto deste (Ben-Ari, 2000). Os folículos apresentam ciclos de desenvolvimento que são caracterizados por três fases: a anágena, a catágena e a telógena. A anágena é a fase do desenvolvimento e crescimento do cabelo (fase em que este está em contacto com os vasos sanguíneos e se dá a incorporação de elementos) (Bencze, 1990). A catágena é uma fase transitória onde ocorre a morte do cabelo (para a irrigação de sangue). Esta morte também pode ocorrer por contaminação elevada por metais. A telógena é a fase em que ocorre a queda do cabelo e o posterior nascimento de um novo folículo (Dirce Pozebon, 1999). Normalmente, cerca de 85% do cabelo encontra-se em anágena, 14% em Telógena e 1% em Catágena. No entanto, tal pode ser alterado por vários factores, como por intoxicação. Os folículos contêm também componentes vasculares, musculares e glandulares (Dirce Pozebon, 1999) (Dunnett and Lees, 2003), cujas estruturas variam consoante a localização no corpo e as suas funções nessas zonas (Dunnett and Lees, 2003).

4.1.2 Estrutura do Pêlo Humano

O pêlo humano é constituído pela medula, córtex e cutícula. A medula por sua vez é constituída por células com forma rectangular ricas em proteínas que proporcionam

uma resistência menor do que a proporcionada pela queratina. O córtex representa o maior volume do cabelo e é constituído por queratinócitos orientados de forma longitudinal. Cerca de 85% do córtex contém células compostas por macro fibrilas ou feixes de queratina que proporciona resistência mecânica e por grânulos de melanina que é mais resistente a ataques de microorganismos. A cutícula é constituída por sobreposições de células que fixam o cabelo ao folículo com células da bainha radicular interna (Dunnett and Lees, 2003). Esta está envolvida também nas principais funções de estrutura de queratina (Chernova, 2002).

A formação e crescimento do pêlo é controlado por processos fisiológicos (Dunnett and Lees, 2003) que decorrem em ciclos que englobam a fase de crescimento e a fase de repouso. A fase de crescimento ocorre na matriz, onde se processa a diferenciação celular; as células são queratinizadas e posteriormente ocorre a morte destas, e a formação e diferenciação de novas células. É este processo que permite o crescimento do cabelo. A fase de repouso ocorre quando o crescimento do pêlo é interrompido e o folículo velho é substituído por um novo (Rod R. Seeley, 2003). O pêlo é, portanto, um tecido vivo que depois de formado não sofre quaisquer transformações biogenéticas. Apesar ser considerado uma barreira passiva à perda de fluídos (Dunnett and Lees, 2003), o pêlo age também como um órgão sensorial que promove o isolamento e ainda dispersa a transpiração produzida pelas glândulas da pele (Ben-Ari, 2000).

4.2 Cabelo Humano

O cabelo humano é anatomicamente igual ao pêlo descrito na secção anterior, pois é também um pêlo do corpo humano. Apresenta uma estrutura cristalina (cerca de 30%) com uma parte amorfa (cerca de 70%), tal como pode ser visualizado através de difracção de raios-x (Dirce Pozebon, 1999).

O cabelo apresenta no seu eixo proteínas (80 a 85%), melaninas (0,3 a 1,52%), água (menos de 15%), lípidos (1 a 9%) e minerais (0.25 a 0.95%) (Dunnett and Lees, 2003). A sua espessura é cerca de 70 μm , onde a cutícula representa cerca de 0.5 μm dessa espessura (Chernova, 2002). É considerado por diversos autores (Dirce Pozebon, 1999) (Kintz, 2012) como um órgão excretor que pode ser utilizado como material de biópsia para elementos existentes no corpo (nomeadamente, elementos traço que são o objectivo de estudo neste trabalho) (Dirce Pozebon, 1999), visto que pode reflectir melhor a acumulação destes elementos do que a urina e o sangue (Marcano et al., 2009). No entanto, não foi determinada a linha de base de concentração de elementos no cabelo (Marcano et al., 2009), existindo apenas intervalos aconselhados (Dirce Pozebon, 1999). A contaminação por elementos pode acontecer de modo exógeno ou de modo endógeno, ou seja, por contaminação interna ou externa e consoante a contaminação que o cabelo apresenta o procedimento a seguir para a sua análise difere (Dirce Pozebon, 1999).

4.2.1 *Análise do Cabelo Humano*

A análise do cabelo humano é um método de detecção não-invasivo (Filistowicz et al., 2011) e não-complexo. No entanto, não existem procedimentos estabelecidos e validados para esta análise (Dirce Pozebon, 1999). Salvo esta situação, a análise do cabelo humano pode ser na determinação de elementos traço, tais como o mercúrio e o chumbo (Marcano et al., 2009). Esta análise pode revelar-nos a exposição actual da pessoa a condições exteriores mas pode também dar-nos todas as passagens revelantes à saúde da pessoa (Dirce Pozebon, 1999), visto armazenar informações relativas à exposição a diversos elementos (Bencze, 1990). Existem cerca de 40 elementos que já foram identificados no cabelo humano (Bencze, 1990). Na figura 4.2 está ilustrada uma imagem do cabelo humano no seu estado normal (4.2a) e uma imagem de um cabelo danificado (4.2b) que sofreu intoxicação.

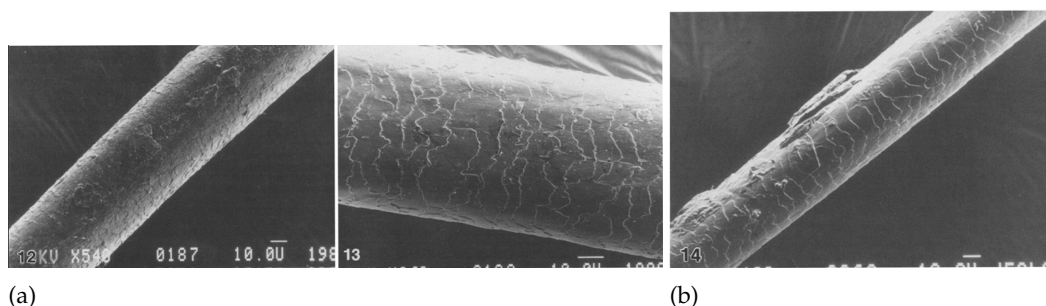


Figura 4.2: a) Padrão da cutícula saudável desenvolvida de um folículo de cabelo humano (Bencze, 1990); b) Microscopia electrónica de varrimento de um cabelo com toxicção por antimónio Sb (Bencze, 1990)

4.2.2 *Semelhanças entre o pêlo do rato e Cabelo Humano*

A espessura da cutícula não é a única diferença entre o pêlo do rato e o cabelo humano (Chernova, 2002). Estes dois pêlos também diferem na medula, a qual no cabelo humano apresenta-se com uma estrutura amorfa e longa, e no pêlo do rato apresenta-se com uma estrutura de escamas. As formas das escamas também diferem, pois as escamas dos pêlos dos ratos assemelham-se mais a pétalas (Lee et al., 2011). No entanto, o folículo do pêlo do rato é muito semelhante ao cabelo do ser humano. Por este facto, é bastante encorajador efectuar certos trabalhos em ratos, visto poderem ser posteriormente relevantes para o ser humano. (Ben-Ari, 2000). A intoxicação por chumbo pode provocar danos na cutícula (Dirce Pozebon, 1999) o que pode ser visualizado por microscopia electrónica de varrimento (Bencze, 1990). Esta informação encontra-se em anexo (Apêndice D).

No nosso estudo utilizámos os ratos wistar pelo que a estrutura do pêlo destes roedores é para nós de grande interesse, a classificação do pêlo do rato wistar encontra-se em anexo (Apêndice C).

Capítulo 5

Técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X

Os raios-X foram descobertos por Wilhelm Conrad Röntgen, na universidade de Würzburg em 1895. Röntgen observou a radiação a partir de tubos de descarga que provocavam um efeito de fluorescência sobre um cartão com sais de bário, mesmo quando o tubo era coberto com papel preto. Esta radiação observada não continha características semelhantes a qualquer outro tipo de radiações, como tal, Röntgen denominou-a de raios-X. Os raios-X são radiação electromagnética com comprimentos de onda no intervalo de 0.01 nm a 10 nm. (Guimaraes, 2010) (Grieken and Markowicz, 2002).

A análise por raios-X utiliza-se normalmente na resolução de problemas analíticos (Nano, 2009b) e baseia-se essencialmente na radiação característica de cada elemento quando submetido a uma fonte de excitação (Guimaraes, 2010).

5.1 *Produção dos raios -x*

A produção de raios-X pode ocorrer de três maneiras diferentes: desaceleração de partículas carregadas (electrões, prótons, iões de partículas alfa), transições electrónicas nas orbitas interiores dos átomos e decaimentos de fontes radioactivas (Skoog and Leary, 1992).

No primeiro processo, as partículas carregadas são aceleradas contra um material alvo onde, são desaceleradas, a sua energia é transformada em radiação electromagnética designada *bremstrahlung*. Esta radiação origina um espectro contínuo de radiação (Grieken and Markowicz, 2002) (Skoog and Leary, 1992).

O segundo processo resulta de transições de electrões entre as orbitais dos átomos do material alvo, provocando ionizações das camadas internas destes. Quando um electrão é ejectado duma camada K por bombardeamento electrónico ou por absorção de um fóton, este fica ionizado e num estado de maior energia ficando instável. Para o átomo retomar a sua estabilidade é necessário que a lacuna seja preenchida (Grieken and Markowicz, 2002).

Este preenchimento normalmente ocorre por electrões das camadas mais externas (camadas L ou M) e é acompanhado pela emissão de um fóton (Grieken and Markowicz, 2002) cuja energia é igual à diferença de energias entre os níveis das camadas que os electrões percorrem (Nano, 2009b). A radiação que resulta deste processo denomina-se fluorescência (Skoog and Leary, 1992) e a sua energia é aproximadamente descrita pela lei de Moseley, segundo a qual a energia dos raios-X depende do número atómico do átomo que a emite.

$$E \sim Z^2. \quad (5.1)$$

Do processo de preenchimento de uma lacuna num átomo pode, em vez de um fóton de raios-x, libertar-se um electrão do próprio átomo sendo o processo conhecido como o efeito de Auger e o electrão que se liberta denomina-se electrão de Auger (Grieken and Markowicz, 2002). A probabilidade do aparecimento de electrões de Auger aumenta com o decréscimo da diferença entre estados de energia correspondentes e é maior para elementos de Z menor (Grieken and Markowicz, 2002).

A energia do electrão de Auger (processo de Auger) depende da diferença entre a energia da lacuna e a energia da camada de onde o electrão se liberta (Nano, 2009b).

Cada átomo contém energias características de transição e assim irá emitir uma radiação característica, que pode ser utilizada para a análise qualitativa e quantitativa dos elementos ou átomos de uma dada amostra (Nano, 2009b).

O terceiro processo de produção de raios-x é o resultado do decaimento de fontes radioactivas. Muitos processos de emissão alfa e beta deixam o núcleo num estado excitado o que faz com que este liberte radiação gama em vez de voltar para o estado fundamental (Skoog and Leary, 1992).

Neste trabalho, apenas se trabalhou com os dois primeiros processos de produção de raios-x.

5.2 *Interação dos raios-x com a matéria*

A interacção dos raios-x com a matéria depende da energia dos fótons e dos átomos que constituem o meio. Quando um feixe de raios-x passa através da matéria a sua intensidade diminui e em consequência existe absorção fotoeléctrica ou dispersão (Skoog and Leary, 1992).

5.2.1 *Absorção fotoeléctrica e Dispersão*

A absorção fotoeléctrica é um processo que origina a saída de um electrão quando existe a incidência de um fóton de raio-x, resultando um ião excitado (Grieken and Markowicz, 2002) (Skoog and Leary, 1992). O efeito fotoeléctrico é um dos efeitos de atenuação da radiação na matéria tendo, por isso, grande importância para o método de análise que se utilizou neste trabalho (Grieken and Markowicz, 2002).

A lei de Lambert- Beer descreve a redução da intensidade da radiação electromagnética na amostra:

$$I = I_0 e^{-\mu d \rho}, \quad (5.2)$$

onde I é a intensidade atenuada em função do coeficiente de absorção mássico (μ), da espessura da amostra (d) e da densidade da amostra (ρ). I_0 é a intensidade que incide na amostra (Nano, 2009b).

A probabilidade máxima de que o fenómeno de absorção ocorra existe quando a energia do fotão incidente é igual ou superior do que energia que é requerida para a remoção do electrão da camada periférica do átomo (Skoog and Leary, 1992). Quando a energia do fotão é inferior à energia de libertação do electrão, este não é ejectado (Grieken and Markowicz, 2002).

A dispersão de radiação na matéria pode ser descrita como conservação da radiação (energia) nos átomos, moléculas e iões e em seguida a reemissão dessa mesma energia em todas as direcções, o que faz com que os átomos voltem à sua estabilidade (Skoog and Leary, 1992).

Existem dois tipos de dispersão, dispersão de Rayleigh e dispersão de Compton (Guimaraes, 2010).

A dispersão de Compton é considerada uma dispersão inelástica entre um fotão e um electrão livre (Grieken and Markowicz, 2002) (Guimaraes, 2010).

A dispersão de Rayleigh é considerada uma dispersão elástica (Nano, 2009b), que ocorre a baixas energias (Guimaraes, 2010) e para moléculas com dimensões significativamente mais pequenas do que o comprimento de onda da radiação (Skoog and Leary, 1992).

A dispersão é mais elevada para elementos leves. A conservação de energia conduz à seguinte expressão em função do ângulo de dispersão θ para a alteração de energia ΔE dos fotões (Nano, 2009b).

$$\Delta E[\text{KeV}] = 1 - (1 - 0.001957 E_{\text{inc}}(1 - \cos(\Theta))^{-1}). \quad (5.3)$$

Na técnica utilizada neste trabalho, a dispersão não contribui para identificação de qualquer elemento, no entanto, contribui para a radiação de fundo do detector (Guimaraes, 2010).

5.3 Reflexão e Refracção

Quando a radiação interage com a matéria existem dois fenómenos que podem ocorrer: a reflexão e a refração.

A medida de interacção da radiação com a matéria é denominada índice de refração

do meio e é descrito por:

$$n_i = \frac{c}{v_i}, \quad (5.4)$$

onde n_i é o índice de refração do meio i , v_i é o módulo da velocidade da radiação no meio e $c(m/s)$ é o módulo da velocidade da radiação no vácuo (Skoog and Leary, 1992).

A refração é uma mudança de direcção da radiação que ocorre quando a radiação, que se propaga entre dois meios com densidades diferentes, atinge a superfície de um dos meios com um dado ângulo relativamente à normal da mesma (ângulo de incidência). Isto deve-se à diferença de velocidades entre os meios (Skoog and Leary, 1992).

O índice de refração depende do comprimento de onda da radiação incidente e do meio onde ocorre refração. Maior comprimento de onda implica uma menor profundidade, logo uma maior absorção da radiação (Guimaraes, 2010).

A reflexão ocorre quando a radiação atravessa uma superfície entre meios de diferentes índices de refração. A fracção de radiação reflectida aumenta com a diferença entre índices refractivos dos meios envolventes (Skoog and Leary, 1992).

5.4 *Espectroscopia de Fluorescência de Raios-x*

A técnica de fluorescência de raios-X tem-se estabelecido como técnica representativa de multi elementar, durante os últimos anos (Carvalho et al., 2007).

A espectroscopia de fluorescência de raios-X é uma técnica de análise onde a amostra é irradiada por um feixe de raios-X a partir de um tubo de raios-X ou de uma fonte radioactiva (Skoog and Leary, 1992). Os elementos da amostra são excitados por absorção do feixe primário e emitem as suas próprias riscas características de fluorescência de raios-x (Skoog and Leary, 1992).

A fluorescência de raios-X (XRF, do inglês "x-ray fluorescence") é uma das técnicas mais utilizadas na identificação quantitativa de elementos com número atómico maior que o do oxigénio ($Z > 8$) (Skoog and Leary, 1992).

Uma das grandes vantagens das técnicas de XRF em comparação com procedimentos químicos por via húmida é que a análise por XRF pode ser realizada directamente em amostras sólidas evitando etapas de digestão húmida (Marguí et al.,).

Apesar dos elevados limites de detecção a comparar com outras técnicas espectroscópicas, a precisão e exactidão do XRF é suficiente para certos fins (Marguí et al.,).

5.4.1 *Micro - Espectroscopia de Fluorescência de Raios-x*

A micro-espectroscopia de fluorescência de raios-X (μ -XRF) é um método de análise não destrutivo bastante utilizado na análise elementar (Nano, 2009b) em várias áreas de investigação, tais como ciências forenses, geologia, ciências da vida, ciências dos materiais, (Kanngieber, 2003)(Mihucz et al., 2010)(Kanngieber et al., 2003) (Malzer et al., 2004).

Através desta técnica é possível efectuar a análise de objectos ou substâncias não homogéneas e irregulares (Nano, 2009b)(Malzer et al., 2004), visto que é possível focar todo o feixe em áreas bastante pequenas (Nano, 2009b).

A μ -XRF utiliza capilares ópticos de raios-x. O capilar óptico é um tipo de óptica de reflexão total, isto é, o feixe de raios-x pode ser influenciado por múltiplas reflexões totais dentro de um capilar. (Nano, 2009b).

Salienta-se que a transmissão de radiação pode influenciar a composição, influenciando a sensibilidade da detecção. Consequentemente, para baixas e altas energias a sensibilidade e os limites de detecção são reduzidos em comparação com a técnica de XRF convencional (Nano, 2009b).

Com a técnica μ -XRF pode fazer-se medições em ar ou em vácuo. No entanto, só elementos mais pesados do que o S e o P podem ser medidos no ar, visto que a radiação característica dos restantes elementos é absorvida pelo ar. Quando se trabalha em vácuo, a absorção é evitada e os elementos leves podem ser detectados, sendo que o elemento mais leve que pode ser analisado é o Sódio (Na). (Nano, 2009b).

Para facilitar a quantificação e identificação de elementos, a radiação fluorescente que chega ao detector é convertida num espectro digital (um impulso), através de um conversor analógico/digital (Nano, 2009a).

Quando o sinal chega é filtrado para reduzir o ruído de fundo. Este processo de filtragem requer algum tempo de processamento e para longos tempos de filtragem, a energia de resolução do detector é melhorada. O canal, aquando da chegada de cada impulso, fecha sendo apenas possível processar um sinal de cada vez. A soma de todos os tempos de processamento é considerada o tempo morto (Nano, 2009b)(Nano, 2009a). O tempo que demora a fazer uma leitura, ou seja, o tempo de medição é a soma entre o tempo que se quer medir num dado ponto e o tempo morto, que é dado pela seguinte expressão (Nano, 2009b)(Nano, 2009a):

$$t_{\text{clock}} = t_{\text{real}} + t_{\text{dead}}, \quad (5.5)$$

onde t_{clock} é o tempo de medição, t_{real} é o tempo previamente definido, pelo utilizador, para a medição e t_{dead} é o tempo morto.

Após a conversão e filtragem, o registo é colocado num espectro (Nano, 2009a). A radiação incidente, ou seja, o impulso que chega ao detector é colocado num canal (Nano, 2009a)(Nano, 2009b). A contagem neste canal aumenta consoante a medição que chega ao detector (Nano, 2009a), onde a altura dos impulsos é proporcional à energia dos raios-x incidentes (Nano, 2009b). É de salientar que o registo no espectro é um processo cumulativo sujeito às leis descritas pela estatística (Nano, 2009a).

Este método de medição também apresenta artefactos devido a má interpretação por parte do equipamento (Nano, 2009b). Os artefactos que podem ocorrer neste método são:

◊Picos soma: estes picos ocorrem quando dois impulsos chegam ao detector e são detectados ao mesmo tempo ou quase ao mesmo tempo, sendo o resultado um pico cuja

a energia é a soma das energias de ambos os impulsos (Nano, 2009b).

◊Picos escape: são picos que aparecem numa posição do espectro que não corresponde à energia real do fóton. Estes picos provêm da radiação de fluorescência libertada das camadas internas do material do detector (Nano, 2009b).

◊Dispersão de Compton e de Rayleigh : No caso da dispersão de Rayleigh (dispersão elástica) gera-se um pico na posição da linha de fluorescência. No caso da dispersão de Compton (dispersão inelástica) gera-se um pico de menor intensidade. A energia depende sempre do número atómico médio da amostra (Nano, 2009b).

$$E_{\text{Compton}} = E_{\text{incidente}}[1 + (0.00196(1 - \cos \theta) \times E_{\text{incidente}})] \quad (5.6)$$

◊Pico de difracção : A radiação do tubo pode ser reflectida na estrutura cristalina da amostra (reflecção de Bragg) que pode gerar artefactos no espectro. Quando esta radiação atinge a estrutura cristalina, o cristal determina a energia da radiação dispersa em direcção ao detector. Assim são criados picos adicionais para materiais cristalinos (Nano, 2009b).

Pelo o que foi dito acima, conclui-se que a qualidade do espectro e a posterior análise de resultados depende da intensidade da fluorescência e do tempo de medição (Nano, 2009a).

Na figura 5.1 está representado um exemplo de um espectro obtido no equipamento Tornado da Brucker utilizado neste trabalho.

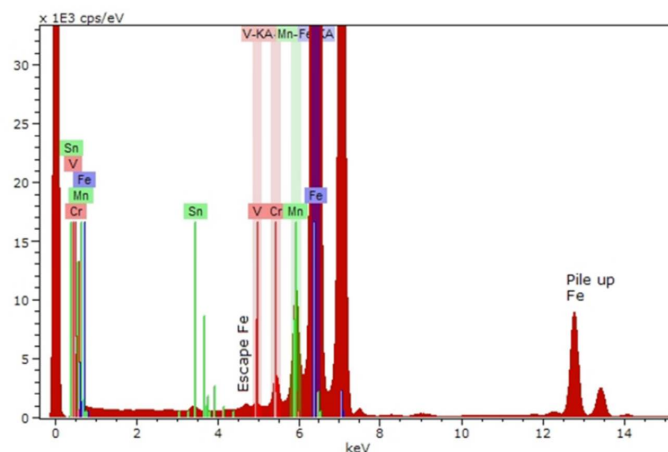


Figura 5.1: Composição de um espectro de WRF: Cada pico de fluorescência apresenta a linha K ou L de um dado elemento. Estes picos são identificados através do eixo dos xx's que se apresenta-se em KeV. Associa-se um valor em KeV a um elemento, através das tabelas. O pico de energia zero não é originado na amostra mas sim criado através da electrónica e é utilizado essencialmente para controlo da electrónica e para calibração de energias. No eixo dos yy's apresentam-se as contagens por segundo (Nano, 2009a).

A identificação dos picos do espectro pode ocorrer de várias maneiras (Nano, 2009b). A maneira mais fácil, mas possivelmente menos eficaz, é por comparação visual. Os marcos dos elementos são mostrados no espectro e é feita a comparação com as linhas

medidas. A existência de uma série de riscas com razões de intensidade é a condição para a identificação.

A identificação de picos pode também ser feita de uma forma semiautomática. Neste caso, quando o cursor está sobre o pico, todas as linhas perto daquela posição são listadas e aí é possível a identificação do elemento (Nano, 2009b).

5.4.2 Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Energia

A Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF) é uma ferramenta rápida para a análise elementar de certas amostras (Gonzalez-Fernandez et al., 2007) pois fornece um meio de identificação de um elemento por medição da sua energia característica de raios-x (Marguí et al.,).

O espectrómetro tradicional de dispersão em energia consiste numa fonte de excitação, num suporte de amostra e num sistema de detecção. Nestes equipamentos, a sua resolução equivale à resolução do detector. (Guimaraes, 2010).

O espectrómetro de XRF com o qual trabalhamos utiliza um tubo de raio-x, onde os electrões são emitidos por um cátodo aquecido, acelerados a alta tensão e focados num alvo metálico refrigerado a água (ânodo). A energia cinética com a qual os electrões o atingem é igual à diferença de tensões entre o cátodo e o ânodo. Desta colisão resulta radiação X que é emitida através de uma janela de berílio (Guimaraes, 2010).

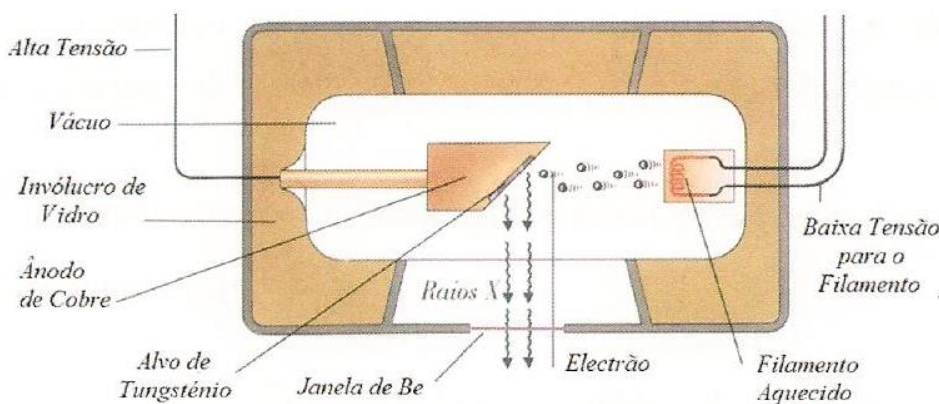


Figura 5.2: Esquema do tubo de Raios X (Guimaraes, 2007).

O equipamento utilizado conta também um alvo secundário que permite obter um feixe quase monocromático quando este é colocado entre a fonte de raios-X e a amostra. Assim, o feixe primário atinge o alvo secundário que por sua vez produz um feixe secundário contendo radiação de *bremsstrahlung* dispersa a partir do tubo de raios-X que irá por sua vez excitar a amostra (Guimaraes, 2010).

Uma das vantagens deste alvo secundário é que este pode ser alterado a fim de obter melhores condições de excitação para uma amostra específica (Gonzalez-Fernandez et al., 2011). A utilização deste alvo secundário também permite uma diminuição do fundo porque a radiação continua do feixe primário é praticamente eliminada apesar de haver

diminuição da intensidade do feixe de raios-x incidente na amostra (Guimaraes, 2007).

O tubo de raios-x, o alvo secundário e a amostra estão posicionados numa geometria tri-axial (figura 5.3) que permite a redução de fundo usando o efeito de polarização do feixe dos raios-x incidentes (Gonzalez-Fernandez et al., 2007) (Gonzalez-Fernandez et al., 2011) e um pequeno angulo sólido do detector o que evita a recolha de outra radiação reduzindo assim a radiação dispersa (Magalhães et al., 2006).

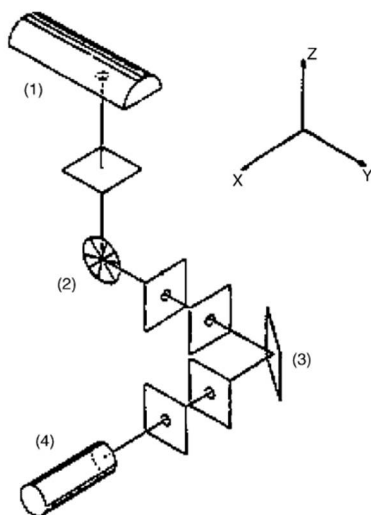


Figura 5.3: Montagem do EDXRF: (1)tubo de raios-x, (2) Alvo secundário de Molibdénio, (3) Amostra, (4) Detector de Si(Li) (Marguí et al.,).

Com esta disposição é possível obter uma fonte monocromática tornando assim possível a escolha do alvo secundário a fim de ser obter melhores condições de excitação (Marguí et al.,).

O detector do equipamento de EDXRF utilizado é um detector de Si(Li) que apresenta resoluções de energia mais adequadas para visualização de linhas características dos elementos (Guimaraes, 2010).

O equipamento também contém um pré-amplificador que faz a recolha de cargas num condensador produzindo um impulso à saída cuja amplitude de tensão é proporcional à energia dos fótons de raios-X (Guimaraes, 2010). O impulso de saída entra num multicanal que converte esta tensão analógica num sinal digital e que incrementa uma unidade no respectivo canal sempre que chega um impulso sendo o espectro resultando um espectro cumulativo (Guimaraes, 2010).

Este método de recolha de cargas é semelhante ao método utilizado na técnica u-XRF (Guimaraes, 2010).

No espectro de raios-X existem três regiões de destaque: a região de energia mais elevada, onde ocorrem a dispersão elástica e inelástica do material do alvo secundário. A região de baixa energia onde ocorrem os picos escape do detector e existe uma alta contribuição do barulho electrónico. A região intermédia é a região que efectivamente se quer analisar pois esta contém as linhas características K e L da amostra. É esta a

região que nos permite identificar os picos dos elementos existentes (Guimaraes, 2010) (Guimaraes, 2007).

5.5 *Análise Quantitativa e Qualitativa*

Quando obtemos um espectro de XRF existem dois tipos de análise que podemos fazer: análise quantitativa e análise qualitativa. A análise qualitativa consiste em olhar para o espectro e identificar cada risca existente no espectro utilizando as linhas $K\alpha$ e $L\alpha$ dos elementos. Existem estudos em que a análise qualitativa não é suficiente e por isso precisa-se de uma análise quantitativa. Esta consiste na determinação da quantidade relativa dos elementos presentes na amostra em ug/g (ou ppm- partes por milhão) (Guimaraes, 2007) (Guimaraes, 2010).

5.5.1 *Análise em EDXRF*

No espectrómetro de EDXRF, utiliza-se o método dos parâmetros fundamentais para a quantificação. Começa-se por fazer a desconvolução precisa e fiável dos espectros a fim de determinar as intensidades da radiação. Tem de se conhecer então o número total de contagens obtidas pela integração da área correspondente a cada pico depois de subtrair o fundo (Guimaraes, 2010).

Este método consiste em assumir uma composição aproximada da amostra desconhecida assumindo que todos os elementos estão igualmente distribuídos na amostra, que a intensidade da radiação de fluorescência de raios-X que é proporcional à concentração do elemento de medição, que os efeitos de outros elementos presentes na amostra podem ser calculados usando parâmetros fixos conhecidos (ex: coeficiente de atenuação) e por fim que a intensidade medida depende da configuração experimental e das condições de medição (Guimaraes, 2010).

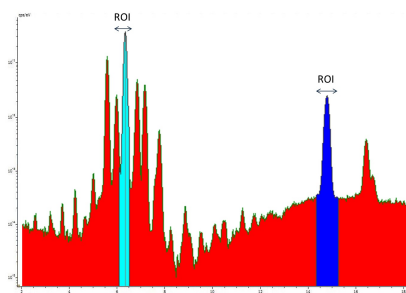


Figura 5.4: Esquema demonstrativo da região de interesse.

O espectro obtido por EDXRF dá-nos o resultado analítico que é o número de contagens registadas pelo detector referentes a um pico característico onde este número é calculado a partir do número total de contagens N numa determinada região de interesse (ROI - Region Of Interest representado na figura 5.4) à qual é subtraída o número de

contagens referentes à área de fundo N_f permanecendo apenas o número de contagens referentes à área do pico N_p uma vez que

$$N = N_p + N_f. \quad (5.7)$$

O limite de detecção (LMD), que é a quantidade de massa ou concentração mínima de um elemento que é possível determinar numa amostra (Guimaraes, 2007) em ug/g, é dado por

$$LMD = c_i((3\sqrt{N_f})/(N_p)), \quad (5.8)$$

onde c_i é a concentração de cada elemento i (Guimaraes, 2007).

5.5.2 *Análise em μ -XRF*

Em μ -XRF a quantificação requer uma análise diferente da que é utilizada no equipamento do EDXRF porque para além de haver variações de amostra para amostra ainda há variações dentro da mesma amostra visto estas poderem ser não homogéneas (Nano, 2009b).

Para efectuar a quantificação no equipamento de μ -XRF basta definir os parâmetros de quantificação. Para a quantificação existem vários modelos tais como o "standardless", a utilização de padrões ou então o modelo "standardless" e o padrão em conjunto. Estes modelos também são baseados nos parâmetros fundamentais (Nano, 2009a).

Para definir os parâmetros com os quais queremos fazer a quantificação temos de escolher um modelo, que até pode ser definido por nós próprios, onde podemos identificar se um elemento está ou não presente na amostra ou se um elemento, que sabemos que aparecem no espectro, ser apenas identificado como elemento que serve para desconvolução (Nano, 2009a).

Para este trabalho criou-se um modelo de quantificação onde foi definido que o elemento Zr e o elemento Rh que são visualizados no espectro serão elementos que pertencem ao equipamento e por isso apenas entram na desconvolução do espectro. Como a quantificação absoluta não pode ser obtida neste equipamento devido a não se conseguirem reproduzir padrões neste espectrómetro devido aos seus baixos limites de detecção procedeu-se a uma quantificação relativa, onde se utilizou para os cálculos a intensidade de cada elemento que nos é dada pelo parâmetro "Net" na quantificação automática (Nano, 2009a).

A relação que existe entre a intensidade da radiação de fluorescência e a concentração de um dado elemento é dada pela lei de Sherman,

$$I_i = G \times \int \frac{\frac{S-1}{S \times c_i \times p_i \times \omega_i \times \tau_i(E)}}{\frac{\mu(E)}{\sin \psi_{inc}} + \frac{\mu(i)}{\sin \psi_{takeoff}}} \times I_0(E) \times dE, \quad (5.9)$$

onde a intensidade varia em função da concentração ([Nano, 2009b](#)).

Assim poderemos utilizar estes valores de área não para conseguir uma quantificação absoluta mas para conseguir uma quantificação relativa e conseguir comparar valores entre espectros.

Capítulo 6

Materiais e Métodos

6.1 *Procedimento Experimental*

Neste trabalho fizeram-se dois trabalhos. Num deles analisou-se o chumbo no pêlo, as unhas e os órgãos dos ratos Wistar (mais precisamente o rim) de modo a tentar obter uma correlação entre a evolução do chumbo no pêlo e unhas e a sua acumulação nos rins. No segundo, estudou-se tecidos cancerígenos de modo a determinar a distribuição dos metais neste tipo de tecidos e de se observar se existe alguma distribuição espacial destes mesmos metais.

6.1.1 *Procedimento Experimental para a Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar*

Escolher o animal a utilizar para experimentos não é fácil pois as características destes devem assimilar-se às características humanas. Entre os animais que se utilizam para a experimentação encontram-se o rato e o hamster ([Schanaider and Silva, 2004](#)). Para este estudo utilizou-se ratos devido ao seu baixo porte, à sua fisiologia parecida à dos humanos e essencialmente devido ao seu baixo preço.

Utilizou-se ratos Wistar, uma espécie de ratos albinos de nome científico *rattus norvegicus*. Estes ratos foram mantidos no Biotério de FCM-UNL creditado pelo alvará emitido pela DGV de onde consta autorização de utilização de animais, pequenos roedores, ao abrigo do disposto na Portaria 1005/ 92 de 23 de Outubro.

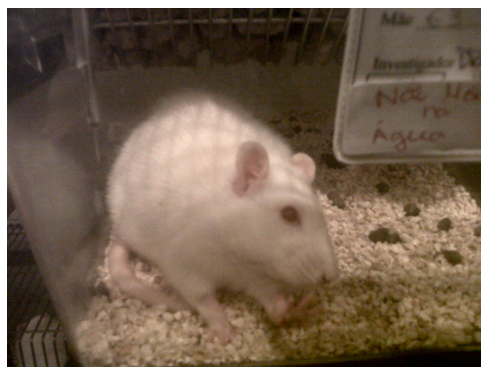


Figura 6.1: Um dos rato wistar utilizado no estudo

Todos os ratos utilizados neste estudo eram fêmeas com uma idade média de um ano e nove meses e de peso médio de 385,4g (As informações deste ratos encontram-se tabeladas em anexo (Apêndice E)). Utilizaram-se dez ratos que foram separados em dois grupos distintos: um grupo de controlo composto por três ratos e um grupo de contaminados composto por sete ratos. Foi administrada uma solução de água deionizada com um suplemente de 0,2% p/v de acetato de chumbo ao grupo de ratos contaminados enquanto que ao grupo de ratos de controlo é apenas administrada uma solução de água deionizada (a água deionizada é água que os animais consomem em quantidade *ad libitum* no biotério). A alimentação é a mesma para ambos os grupos, esta também *ad libitum*. Os ratos foram colocados em gaiolas separadas e devidamente alimentados. Os bebedouros foram cuidadosamente colocados de modo a evitar a contaminação exterior do pêlo. O facto de cada rato estar numa gaiola isolada dos restantes permite um controlo do consumo de água que cada rato faz diariamente (este valores encontram-se tabelados em anexo). As gaiolas são mantidas a $18 \pm 1,^{\circ} \text{C}$ e com uma humidade relativa de $60 \pm 10\%$ e num ciclo de luz de 12h-12h.

6.1.1.1 Recolha de Pêlos

O ensaio durou doze semanas. Durante estas doze semanas os ratos permaneceram na sala de recobro no biotério de Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. A recolha do pêlo foi efectuada de duas em duas semanas. Recolheram-se cerca de dez pêlos de cada rato de duas zonas anatómicas: dorso e abdómen. De cada rato também se recolheu uma vibrissa porque apesar de ser um órgão sensível mecano-complexo do rato é também um pêlo (Voges et al., 2012).

O pêlo foi colectado com uma pinça de modo a que se consiga recolher o pêlo com o folículo incorporado. Este foi armazenado em caixas de pétri devidamente identificadas com o nome do rato e a zona do pêlo que se recolheu.

Durante o ensaio foram analisados os aspectos micro e macroscópicos dos pêlos de cada rato assim como o aspecto de rato em si.

6.1.1.2 Recolha de Órgãos e Ossos

Ao fim de dozes semanas de ensaios, os animais foram submetidos a anestesia geral para última recolha dos pêlos e para recolha dos tecidos e ossos. A anestesia geral foi efectuada através de uma injeção intra peritoneal de quetamina/xilazina nas doses 90 mg/Kg e 10 mg/kg, respectivamente. Antes de se iniciar a cirurgia confirmam-se a profundidade anestésica verificando a ausência do reflexo de pedal fazendo moderada pressão sobre a pata posterior.

A morte do animal dar-se-á aquando da recolha dos órgãos e tecidos, no entanto, quando a recolha termina serão verificados os sinais vitais de cada animal. Caso estes apresentem sinais vitais procede-se então à eutanásia com monóxido de carbono.

Os animais são dissecados com o recurso a um microscópio binocular sendo recolhidos de todos as animais (controlo e contaminados) o osso íliaco, o fémur e a tíbia, o fígado, os rins, os pulmões, o nervo isquiático e 1cc de sangue.

Os ossos e os órgãos de cada animal são colocados separadamente em diferentes recipientes de plástico devidamente identificados com a adição de 10% de para-formaldeído com um pH de 7.4 e armazenados a 2°C para evitar a deterioração. Após 48 horas de estarem em para-formaldeído, os órgãos e ossos são colocados numa solução de etanol a 70% onde ficam até que sejam utilizados para a análise. Também são recolhidas duas a três unhas das patas traseiras de cada rato que são posteriormente colocadas em caixas de petri devidamente identificadas. Tal como o pêlo, as unhas também não necessitam de qualquer tratamento posterior.

6.1.1.3 Preparação das amostras

Pêlo O pêlo depois de recolhido manteve-se em caixas de petri devidamente identificadas. Para a análise do pêlo realizaram-se medidas em dois equipamentos distintos mas ambos com a mesma base na experimentação: O μ -XRF e o EDXRF. Para tal efectuaram-se duas montagens para o pêlo, uma para cada método de análise.

Para o método de μ -XRF colaram-se numa caixa de petri três partes de uma fita de carbono. Em cada uma das partes foi colocado cerca de três a quatro pêlos de uma zona anatómica (à excepção da vibrissa que era só uma) e identificada como tal. Esta montagem pode ser observada na figura 6.2.

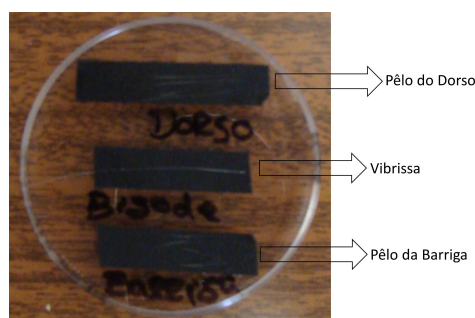


Figura 6.2: Montagens dos pêlos dos ratos wistar com fita de carbono em caixas de petri.

Para a observação por EDXRF utilizaram-se slides com folha de mylar. Este slide é um suporte de 50×50 mm onde é colocada uma folha de mylar bem esticada. Nesta folha de mylar cola-se um pouco de cola onde posteriormente se adiciona um conjunto de pêlos. Isto pode ser visualizado na figura 6.3. Cada slide é devidamente identificado com o nome do rato e a recolha que se mediu.



Figura 6.3: Montagens dos pêlos dos ratos wistar com fita de carbono em slide.

Rim Dos animais estudados, apesar de se ter recolhido bastantes órgãos, apenas se observou o rim. O rim, que estava conservado numa solução de etanol a 70%, foi colocado sobre uma caixa de petri onde, com a ajuda de um bisturi, foi cortado ao meio e posteriormente uma dessas metades foi fatiada numa fatia mais pequenas com cerca de 1 mm de espessura. Retiraram-se essas metades as quais foram colocadas em etanol a 100% onde repousou durante cerca de 1 hora. Depois cada fatia de rim foi passada por uma solução de Xylol onde permaneceu cerca de 50 min. Esta passagem por xylol permite que todas as moléculas de água que estejam no tecido sejam substituídas por xylol. Depois de retirada a fatia de tecido do Xylol, este fica a secar durante a noite numa caixa de petri de vidro onde se dava a evaporação total do xylol e assim a secagem do tecido. Este procedimento foi repetido para um rim de cada rato. Posteriormente o tecido foi colocado, tal como o pêlo, em slides com uma fita de carbono (como se pode observar na figura 6.4) para posterior observação por μ -XRF no equipamento Tornado da Brucker.



Figura 6.4: Montagens dos rins dos ratos wistar com fita de carbono em slides com mylar.

Unha As unhas foram colocadas, tal como o rim e os pêlos em fita de carbono (como se pode observar na figura 6.5). Esta fita de carbono foi colocada na tampa posterior de uma caixa de petri para posterior observação por μ -XRF.

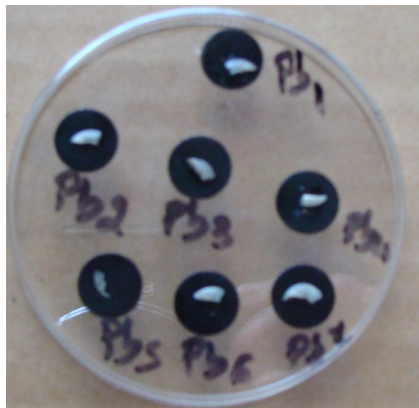


Figura 6.5: Montagens das unhas dos ratos wistar contaminados em fita de carbono nas caixas de petri.

6.1.1.4 Técnica de análise

Pêlo A montagem previamente feita com o pêlo de cada rato foi colocada na plataforma do equipamento de μ -XRF. Para adquirir um bom espectro do espectrómetro utilizou-se um filtro de Alumínio/Titânio/Cobre com espessura de 100 μ m, 50 μ m e 25 μ m, respectivamente, uma tensão de 20 kV e uma corrente de 380 μ A. As medições foram todas efectuadas em vácuo de modo a evitar o pico de Ar (argon). Fizeram-se medições de 500s em cada espectro.

A segunda montagem do pêlo (a montagem do slide com cola) foi colocada no porta amostras do aparelho de raios-X. Seguidamente, ligou-se o aparelho com uma tensão de 50kV e uma corrente de 20 mA. Como o aparelho é controlado por um computador ligado a um multicanal bastou iniciar a aquisição no computador. O tempo de aquisição utilizado para cada amostra foi de 1000s.

No apêndice H, nas figuras H.5 e H.6 encontram-se dois espectros, um representativo do primeiro equipamento e outro representativo do segundo equipamento. Ao compara os espectros conseguimos visualizar que, devido aos baixos limites de detecção do equipamento de μ -XRF e devido à baixa espessura do pêlo, o equipamento de EXDRF mostrou-se mais eficaz para este tipo de medições, Sendo por isso utilizados os dados recolhidos por EDXRF para análise de resultados.

Rim e Unha Tanto para a montagem do rim como para a montagem das unhas seguiu-se o mesmo procedimento. A montagem previamente efectuada para o rim e para a unha foi colocada na plataforma do tornado. Depois de fechada a tampa da câmara de acesso ao exterior evacuou-se a câmara até atingir 20mBar. Fizeram-se mapeamentos de modo a conseguir obter um espectro cumulativo que permitisse obter a concentração total de todos os elementos existentes no rim e na unha, e ao mesmo tempo que nos fornecesse uma distribuição dos mesmos.

As aquisições tiveram tempos variáveis entre si visto que cada rim e cada unha tinham um tamanho diferente de rato para rato, no entanto, a tensão e a corrente utilizada

foram iguais em todos e foram de 30Kv e 380 μ A respectivamente. O numero de ciclos que foi feito em cada órgão foi de 10, onde se fizeram medições pontuais de 20 em 20 μ m e com um tempo por pixel de 2,21 ms. O esquema ilustrativo deste mapeamento está representado na figura 6.6.

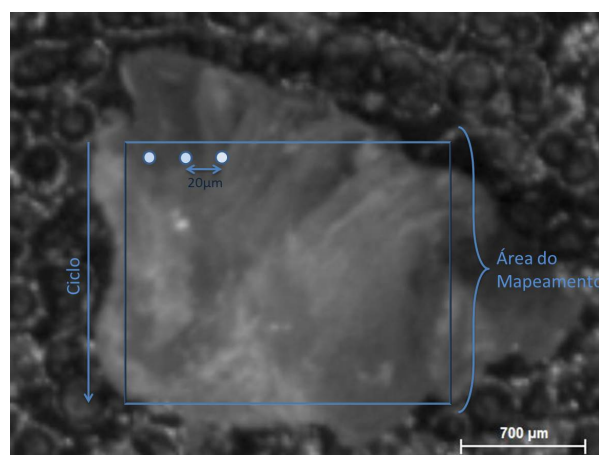


Figura 6.6: Esquema ilustrativo do mapeamento. Cada círculo representa um pixel.

6.1.2 *Procedimento Experimental para Tecido Cancerígenos*

No estudo de tecidos cancerígenos foram utilizados 10 tecidos retirados em biópsias, nomeadamente, tecidos dos pulmões, dos rins e do colón. Para o pulmão temos dois tecidos, um saudável e outro que contem neoplasia. Para os rins temos quatro tecidos, dois saudáveis e os outros dois com neoplasia. Por fim, para o cólon temos também quatro tecidos, dois saudáveis e dois com neoplasias.

Estes tecidos foram conservados em etanol a 70% tal como se conservou os órgãos recolhidos dos ratos. Foram colocados no frigorífico até a posterior preparação das amostras para observação.

6.1.2.1 *Preparação das amostras*

As amostras de tecidos cancerígenos foram preparadas utilizando o mesmo método atrás descrito para os tecidos dos ratos. Foram cortados em pequenos pedaços com cerca de 1 mm de espessura colocados em etanol a 100% cerca de uma hora e depois colocados em xylol cerca de 50 minutos. Foram colocados em caixinhas de petri de vidro onde pernhoitaram de modo a secarem.

Depois desta secagem foram colocados em folha de mylar que previamente já tinha sido colocada no slide 50X50 mm. A figura 6.7 apresenta a montagem experimental efectuada.



Figura 6.7: Esquema ilustrativo das montagens dos tecidos cancerígenos utilizados no estudo

6.1.2.2 Técnica de análise

Depois de preparados, os slides foram colocados sobre a plataforma do equipamento de μ -XRF de modo a se proceder à análise dos tecidos. Depois de fechada a tampa de acesso ao exterior evacuou-se a câmara até atingir 20mBar. A tensão utilizada para as leituras foi de 30 kV e uma corrente de 380 μ A. Para cada tecido fez-se um mapeamento seleccionando-se uma área de tecido igual para todos de modo a fazer um espectro cumulativo de todos os tecidos a fim de comparar qual a concentração total de todos os elementos que existe em cada tecido e poder comparar os tecidos entre si. A área utilizada foi sempre igual para todos os tecidos sendo esta um rectângulo com altura de 2,57 mm e largura de 3,38 mm.

No mapeamento, fizeram-se 5 ciclos de medição, com uma distância de medição em cada linha de 20 μ m entre cada ponto e com um tempo por pixel de 3,21 ms.

6.2 Análise Estatística

Para a realização deste trabalho efectuou-se uma análise do tamanho amostral nas experiências animais. Para que se pudesse utilizar testes paramétricos nos ensaios com ratos Wistar teríamos de ter uma amostra superior a 15/20 ratos. No entanto, por motivos éticos e económicos, não se conseguiu utilizar uma amostra com este tamanho. Trabalhou-se, então, com uma amostra de tamanho 10 ($n=10$).

Assim utilizaram-se testes não-paramétricos para efectuar os cálculos estatísticos, nomeadamente o teste Mann-Whitney U que serve para a análise de duas variáveis independentes e o Coeficiente de Correlação de Spearman.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Origin*, versão 8 e considerou-se estatisticamente significativo um valor de p inferior a 5%, ou seja, $p < 0,05$ (Guimaraes, 2010).

A correlação de Spearman é utilizada como medida não paramétrica que relaciona duas variáveis, isto é, determina se a relação entre duas variáveis é significativa. Os valores da correlação de Spearman, R_s , variam entre +1 e -1, sendo que +1 implica uma relação positiva perfeita entre as variáveis e -1 uma relação negativa perfeita entre as variáveis. É importante também a análise da probabilidade de erro, valor p , que como dito anteriormente tem de ter um valor inferior a 0,05 para se poder considerar estatisticamente significativo.

A correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar os rins com o pêlo, os rins com as unhas, as unhas com os pêlos e os pêlos do dorso com os pêlos da barriga dos ratos Wistar.

O teste Mann-Whitney é um teste não paramétrico que compara duas populações independentes. Este teste contém uma hipótese estatística que consiste em duas hipóteses diferentes: A hipótese nula, H_0 , e a hipótese alternativa, H_1 , onde H_0 pode ser uma hipótese inferior ou igual a um dado valor e H_1 pode ser superior a dado valor. Para este trabalho utilizou-se como hipótese nula H_0 a de populações serem idênticas e a hipótese H_1 a de as populações não serem idênticas (R.D.Andrews, 2010).

Utilizou-se o teste Mann-Whitney U para a comparação entre ratos contaminado e ratos de controlo de concentrações chumbo entre rins, unhas e pêlos dos ratos wistar (Guimaraes, 2010).

Capítulo 7

Resultados e Conclusões

7.1 *Resultados*

Fizeram-se duas análises de resultados diferentes. Uma delas para o primeiro estudo com os ratos wistar e a outra para o estudo dos tecidos cancerígenos.

É importante salientar que quando se utiliza o equipamento de μ -XRF são realizados dois tipos de medições. Um destes tipos de medições visa medir os elementos mais leves (P, S, K, Ca, Ti) que possam existir na amostra sendo que este tipo de medição não se utiliza qualquer filtro no equipamento. O outro visa medir os elementos mais pesados (Fe, Zn, Cu, Br), sendo que se utiliza um filtro de Alumínio/Titânio/Cobre com espessura de 100 μm / 50 μm / 25 μm , respectivamente.

Isto ocorre devido ao equipamento de μ -XRF ter algumas limitações de tal forma que para se obter bons resultados para ambos os elementos.

7.1.1 *Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar*

Ao longo de 12 semanas de estudo observaram-se diferenças físicas nos ratos Wistar. Os ratos que estavam a ser contaminados por chumbo, começaram a ter um pêlo menos lustroso e mais arrepiado. Um dos ratos contaminados ficou bastante debilitado a nível motor, sendo que a sua deslocação era feita com muita dificuldade. Outros dois ratos, um contaminado e o outro de controlo, morreram às 11 semanas de estudo.

Para fazer a análise dos resultados obtidos por μ -XRF e por EDXRF fizeram-se correlações de Spearman entre rins e unhas, rins e pêlos do dorso, rins e pêlos da barriga, unhas e pêlos da barriga, unhas e pêlos do dorso e por fim pêlos da barriga e pêlos do dorso.

7.1.1.1 *Correlação entre tecidos e pêlos*

Recolheram-se os dados para os rins e as unhas de todos os ratos wistar através de μ -XRF e para os pêlos do dorso e da barriga dos ratos através de EDXRF. É importante salientar que os valores resultantes da técnica de μ -XRF são valores de intensidade e não de concentração. No entanto, como vimos anteriormente na secção 5.4.1, a intensidade é directamente proporcional à concentração de um dado elemento.

A Tabela 7.1 apresenta os valores de chumbo obtidos para o rim, a unha e os pêlos de cada um dos ratos wistar utilizados no estudo.

Como o equipamento de μ -XRF fornece a intensidade dos picos é necessário uma linha de base para poder fazer a comparação dos valores obtidos. Considera-se a linha de base dada pelos valores mais altos do rim e da unha dos ratos de controlo de modo

Dados dos ratos Wistar						
Ratos	Rim (Intensidade)	Pêlos do Dorso (ppm)	Incerteza (%)	Pêlos da Barriga (ppm)	Incerteza (%)	Unha (Intensidade)
1	32509	0	0	0	0	1163
2	34980	5,10	2	18,89	7,4	783
3	8164	0	0	0	0	1127
4	57693	593,94	8,3	52,49	4,9	6426
5	15808	0	0	0	0	920
6	24831	8,74	0,2	0	0	1065
7	46058	198,75	7,1	28,69	6,7	2970
8	4698	0	0	0	0	1240
9	7915	0	0	0	0	2567
10	4521	0	0	0	0	898

Tabela 7.1: Valores de Chumbo (Pb) para os Ratos Wistar. Os dados do rim e da unha foram recolhidos com a técnica μ -XRF enquanto que os dos pêlos foram recolhidos com a técnica EDXRF.

a fazer-se a linha de base para os restantes valores. Na Tabela 7.2 estão listados os resultados após a consideração da linha de base.

A figura 7.1 apresenta um gráfico de barras onde os dados da tabela 7.2 estão representados.

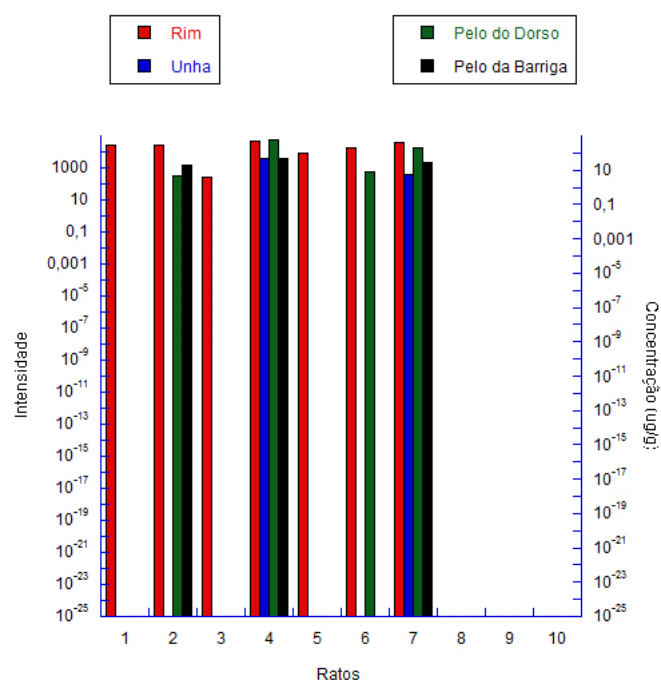


Figura 7.1: Dados da tabela 7.2. É de salientar que o eixo vertical à direita apresenta concentrações para os pêlos e o eixo vertical à esquerda apresenta intensidades para os rins e unhas.

Dados dos ratos Wistar						
Ratos	Rim (Intensidade)	Pêlos do Dorso (ppm)	Incerteza (%)	Pêlos da Barriga (ppm)	Incerteza (%)	Unha (Intensidade)
1	24594	0	0	0	0	0
2	27065	5,10	2	18,89	7,4	0
3	249	0	0	0	0	0
4	49778	593,94	8,3	52,49	4,9	3859
5	7893	0	0	0	0	0
6	16916	8,74	0,2	0	0	0
7	38143	198,75	7,1	28,69	6,7	403
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Tabela 7.2: Concentrações de chumbo (Pb) nos Ratos Wistar após ter sido considerada uma linhade base.

		Rim	Pêlos da Barriga
Rim	Rs	1	0,90633
Rim	Sig.	-	0,0049
Pêlos da Barriga	Rs	0,90633	1
Pêlos da Barriga	Sig.	0,0049	-

Tabela 7.3: Correlação de Spearman entre o rim e os pêlos da barriga

Pela observação da figura 7.1 pode concluir-se que os ratos, cuja intoxicação por chumbo atingiu todo o organismo, foram os ratos 4 e 7. O rato 7 morreu às 11 semanas de ensaio e o rato 4 começou a apresentar dificuldades motoras às 7 semanas de ensaio.

Seguidamente utilizou-se o teste de U-Mann Whitney e a correlação de Spearman para investigar se existia algum tipo de ligação entre as amostras. Estas análises foram efectuadas através da utilização do programa computacional Origin.

Primeiramente efectuou-se a correlação de Spearman entre todas as amostras, cujos os resultados estão listados nas tabelas 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7 e 7.8.

Analisando todas as tabelas pode verificar-se que todos os coeficientes de correlação (Rs) se situam entre 0,5 e 1 e que todos os sigmas (ou seja, os p -value) são todos menores do que 0,05. Isto permite concluir que existe uma correlação positiva entre todas as amostras deste estudo.

Seguidamente efectuou-se o teste de U-Mann Whitney de modo a perceber se ambas as distribuições relativamente aos ratos contaminados e não contaminados para rins,

		Rim	Pêlos do Dorso
Rim	Rs	1	0,81537
Rim	Sig.	-	0,0254
Pêlos do Dorso	Rs	0,81537	1
Pêlos do Dorso	Sig.	0,0254	-

Tabela 7.4: Correlação de Spearman entre o rim e os pêlos do dorso.

		Rim	Unha
Rim	Rs	1	0,80178
Rim	Sig.	-	0,0301
Unha	Rs	0,80178	1
Unha	Sig.	0,0301	-

Tabela 7.5: Correlação de Spearman entre o rim e a unha.

		Pêlos do Dorso	Unha
Pêlos do Dorso	Rs	1	0,83205
Pêlos do Dorso	Sig.	-	0,02024
Unha	Rs	0,83205	1
Unha	Sig.	0,02024	-

Tabela 7.6: Correlação de Spearman entre os pêlos do dorso e a unha.

		Pêlos do Dorso	Pêlos da Barriga
Pêlos do Dorso	Rs	1	0,83831
Pêlos do Dorso	Sig.	-	0,01847
Pêlos da Barriga	Rs	0,83831	1
Pêlos da Barriga	Sig.	0,01847	-

Tabela 7.7: Correlação de Spearman entre os pêlos do dorso e os pêlos da barriga.

		Pêlos da Barriga	Unha
Pêlos da Barriga	Rs	1	0,88465
Pêlos da Barriga	Sig.	-	0,00815
Unha	Rs	0,88465	1
Unha	Sig.	0,00815	-

Tabela 7.8: Correlação de Spearman entre os pêlos da barriga e a unha.

		Primeira Recolha	Última Recolha
Primeira Recolha	Rs	1	0,8895
Primeira Recolha	Sig.	-	0,00734
Última Recolha	Rs	0,8895	1
Última Recolha	Sig.	0,00734	-

Tabela 7.9: Correlação de Spearman para os pêlos da barriga.

unhas e pêlos são significativamente diferentes ou significativamente iguais.

Considerou-se a opção H0 como sendo as distribuições significativamente iguais (hipótese nula) e a opção H1 como sendo as distribuições significativamente diferentes. Os cálculos para este teste estatístico também foram efectuados no programa Origin. Os resultados encontram-se tabelados no apêndice H.

Através dos resultados destes testes de U-Mann Whitney observa-se que as únicas amostras que seguem a hipótese H1 são os rins. Isto é, percebe-se que estes se apresentam significativamente diferentes para ratos contaminados e não contaminados.

7.1.1.2 Evolução do Chumbo no Pêlo

Passamos a analisar a evolução temporal da concentração de vários elementos dos pêlos dos ratos 4 e 7, visto que são os únicos que apresentam diferenças significativas relativamente aos ratos de controlo.

Rato 4 Os dados relativamente ao rato 4 encontram-se tabelados no apêndice H.

A figura 7.2 apresenta os gráficos dos elementos encontrados no pêlo do dorso e no pêlo da barriga na primeira recolha de pêlos e na última recolha de pêlos.

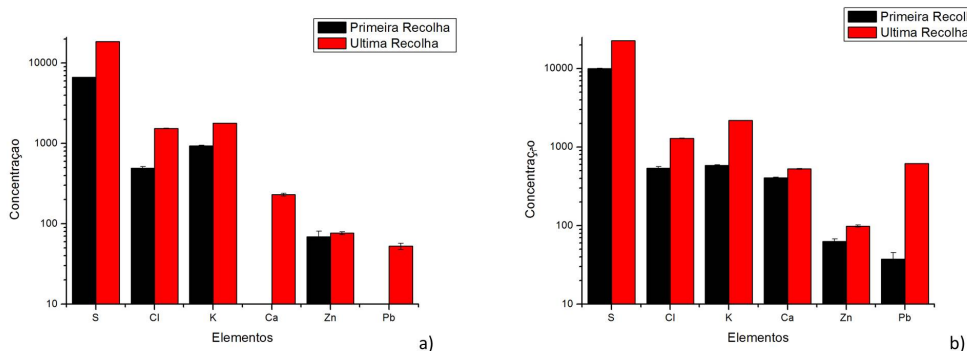


Figura 7.2: Dados recolhidos do equipamento de EDXRF. a) Gráfico de barras com os dados do pêlo da barriga. b) Gráfico de barras com os dados do pêlo do dorso.

Pela observação desta figura podemos concluir que existe um aumento, tanto nos pêlos do dorso como nos pêlos da barriga, de todos os elementos analisados. É de salientar que na primeira recolha de pêlo, portanto, às duas semanas de ensaios já existia uma pequena concentração de chumbo encontrada nos pêlos do dorso mas não nos pêlos da barriga.

Seguidamente determinou-se o coeficiente de Spearman de modo a verificar se existe uma correlação entre a primeira e a última recolhas para o pêlo do dorso e para o pêlo da barriga. Os resultados obtidos encontram-se listados nas tabelas 7.9 e 7.10.

		Primeira Recolha	Última Recolha
Primeira Recolha	Rs	1	0,89286
Primeira Recolha	Sig.	-	0,00681
Última Recolha	Rs	0,89286	1
Última Recolha	Sig.	0,00681	-

Tabela 7.10: Correlação de Spearman para os pêlos do dorso.

		Primeira Recolha	Última Recolha
Primeira Recolha	Rs	1	0,43346
Primeira Recolha	Sig.	-	0,33127
Última Recolha	Rs	0,43346	1
Última Recolha	Sig.	0,33127	-

Tabela 7.11: Correlação de Spearman para os pêlos da barriga.

Como se pode visualizar, ambos os pêlos (dorso e barriga) apresentam correlação positiva da primeira recolha para a última recolha, sendo o coeficiente de correlação para o pêlo do dorso de $R_s = 0,893$ e o coeficiente de correlação para a barriga de $R_s = 0,890$.

Rato 7 Os dados relativamente ao rato 7 encontram-se tabelados no apêndice [H](#).

A figura [7.3](#) apresenta os gráficos dos elementos encontrados no pêlo do dorso e no pêlo da barriga na primeira recolha de pêlos e na última recolha de pêlos.

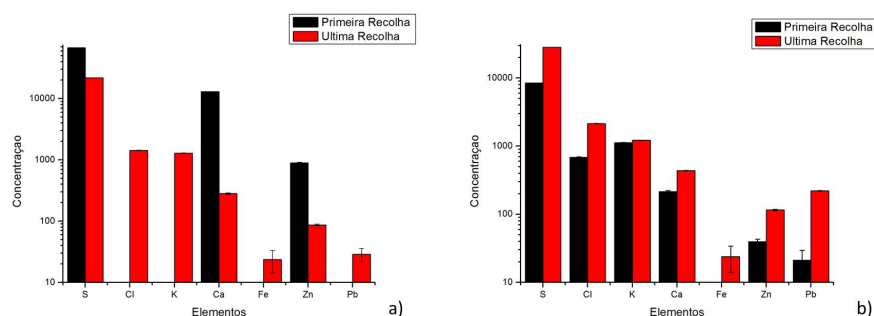


Figura 7.3: Dados recolhidos do equipamento de EDXRF. a) Gráfico de barras com os dados do pêlo da barriga. b) Gráfico de barras com os dados do pêlo do dorso.

Pela observação desta figura pode concluir-se que os pêlos do dorso apresentam um aumento de concentração de todos os elementos encontrados da primeira para a última recolha, tal como ocorreu para o rato 4. No entanto, para os pêlos da barriga isto não ocorre visto que existe um aumento para certos elementos (Cl, K, Fe e Pb) mas existe uma diminuição para os outros (S, Ca e Zn). É de salientar também que mais uma vez se verifica uma concentração de chumbo na primeira recolha apenas para os pêlos do dorso.

Tal como para o rato 4, também para o rato 7 será calculado o coeficiente de Spearman de modo a verificar se existe alguma correlação entre as recolhas de pêlos e os seus elementos. Os resultados obtidos encontram-se listados nas tabelas [7.11](#) e [7.12](#).

Pela observação dos resultados percebe-se que nos pêlos do dorso existe uma correlação positiva da primeira para a última recolha, pois este apresenta um coeficiente de Spearman de $R_s = 0,930$ e um $p\text{-value} = 0,00252$. No entanto, para os pêlos da barriga

		Primeira Recolha	Última Recolha
Primeira Recolha	Rs	1	0,92857
Primeira Recolha	Sig.	-	0,00252
Última Recolha	Rs	0,92857	1
Última Recolha	Sig.	0,00252	-

Tabela 7.12: Correlação de Spearman para os pêlos do dorso.

não existe qualquer correlação, visto estes apresentarem um p -value= 0,33127 que não corresponde ao p -value inferior a 0,05 que se considerou inicialmente.

7.1.1.3 Análise de Outros Elementos nos Ratos Wistar

Os objectivos deste estudo centram-se essencialmente na evolução do chumbo no organismo do rato Wistar. No entanto, também é importante verificar se existem influências por esta contaminação noutros elementos presentes no organismo dos ratos. Sabe-se da literatura que o chumbo inibe e imita o cálcio nas suas funções e que interage com o enxofre levando a efeitos tóxicos (Moreira, 2004) (Othman and El Missiry, 1998). Assim, seguidamente irá fazer-se uma análise de outros elementos do rim, unha e pêlos e correlacioná-los com o chumbo.

Rim De modo a determinar a concentração de cada elemento entre ratos contaminado e ratos de controlo construiu-se gráficos de barras para cada um dos elementos encontrados nos rins dos ratos. Os gráficos encontram-se no apêndice H na figura H.1.

Pela observação desses gráficos percebe-se que apenas quatro desses elementos apresentam diferenças entre ratos contaminados e de controlo que são eles o enxofre (S), o potássio (K), o cálcio (Ca) e o zinco (Zn). A diferença visível é uma diminuição deste elementos de ratos contaminados para os ratos de controlo.

Para este quatro elementos realizou-se o teste U-Mann Whitney comparando os ratos contaminados com os ratos de controlo (Os resultados obtidos através do programa Origin encontram-se H nas secções H.9, H.10, H.11 e H.12).

Pode concluir-se que apesar se existir uma diminuição visível nestes elementos de ratos contaminados para ratos de controlo, o teste U-Mann Whitney confirmou que a distribuição da amostra de ratos contaminados é estatisticamente diferente da distribuição da amostra dos ratos de controlo.

Seguidamente analisam-se as correlações destes quatro elementos para os ratos 4 e 7 por serem estes que apresentam maior contaminação por chumbo. No gráfico da figura 7.4 apresentam-se os valores desses quatro elementos nos ratos 4 e 7.

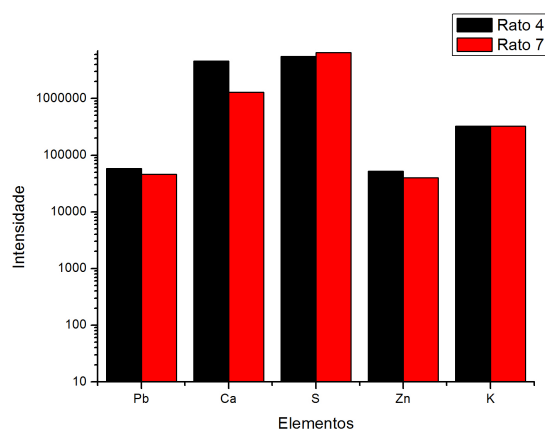


Figura 7.4: Gráfico de barras com a intensidade dos elementos enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), zinco (Zn) e chumbo (Pb) nos ratos 4 e 7.

Observamos que a correlação de potássio (K) é a mesma nos dois ratos e que o rato que tem mais chumbo apresenta menos enxofre, mais cálcio e mais zinco.

Unha Seguidamente para a unha também se construíram gráficos de barras para cada um dos elementos encontrados nas unhas dos ratos. Os gráficos encontram-se no apêndice H.

Pela observação destes gráficos em apêndice conclui-se que não existe nenhum elemento que apresente uma relação entre ratos contaminados e ratos saudáveis. No entanto, quando se observou as variações dos elementos apenas para os ratos 4 e 7 verificou-se que estes apresentam os valores de cálcio mais elevados em relação aos outros ratos contaminados. Isto poderá ser uma influência do chumbo. A figura 7.5 apresenta um gráfico com os valores de cálcio e chumbo para os ratos 4 e 7 de modo a correlacionar estes dois elementos.

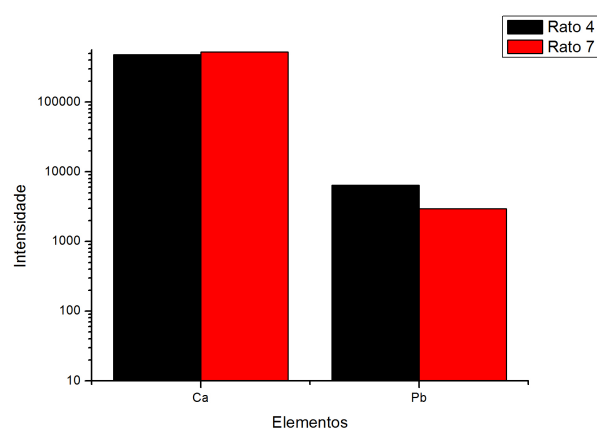


Figura 7.5: Gráfico de barras com a intensidade do cálcio (Ca) e do chumbo (Pb) nos ratos 4 e 7.

Observando esta figura conclui-se que o rato que contém mais chumbo (rato 4) é o que contém menos cálcio e o que contém mais cálcio (rato 7) contém menos chumbo. No

Teste U-Mann Whitney para o Zn		
U	Z	Prob> U
18	1,59545	0,11061

Tabela 7.13: Teste U-Mann Whitney para o elemento Zn dos pêlos do dorso.

entanto, a diferença na concentração de cálcio entre estes dois ratos não é muito significativa.

Pêlo do Dorso Tal como se efectuou anteriormente, construiu-se gráficos de barras para cada um dos elementos encontrados nos pêlos do dorso dos ratos wistar. Os gráficos encontram-se no apêndice H na figura H.3.

Analisando os gráficos do apêndice, o único elemento que apresenta uma correlação entre ratos contaminados e ratos de controlo é o zinco (Zn). De modo a perceber se esta relação é viável iremos realizar o teste de U-Mann Whitney.

Com o auxílio do programa Origin obtivemos a tabela 7.13.

Pela análise da tabela acima consegue-se verificar que as duas distribuições (ratos contaminados e ratos não contaminados) não são significativamente diferentes e, por isso, não existe uma correlação do Zn entre ratos contaminados e não contaminados.

Para finalizar a análise dos pêlos do dorso dos ratos wistar, construiu-se o gráfico de barras apresentado na figura 7.6.

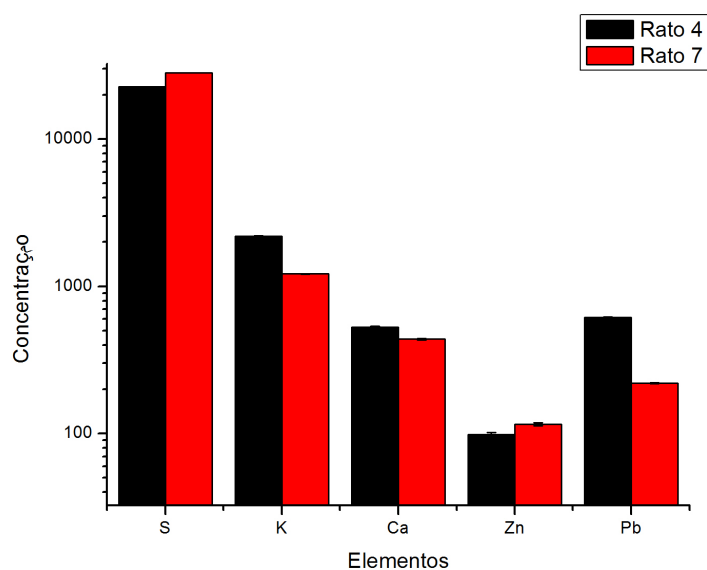


Figura 7.6: Gráfico de barras com a concentração de todos os elementos encontrados nos pêlos do dorso dos ratos 4 e 7.

Observando este gráfico conclui-se que quando os valores de chumbo são mais elevados existem valores de cálcio mais elevados (tal como ocorre no rim) e também se apresentam valores de potássio mais elevados, por outro lado, menores valores na concentração de chumbo correspondem a maiores valores de enxofre e zinco.

Pêlo da Barriga O estudo efectuado para o pêlo da barriga foi semelhante ao estudo realizado para o pêlo do dorso. Construíram-se gráficos de barras para todos os elementos do pêlo da barriga. Este gráficos podem ser visualizados na figura H.4 do apêndice H.

Pela observação dos mesmos não parece existir qualquer tipo de relação para os elementos dos ratos. No entanto, realizou-se a análise dos elementos para o rato 4 e para o rato 7. Construiu-se um gráfico de barras para os elementos destes dois ratos de modo a compreender que possíveis relações existem entre estes. Este gráfico encontra-se representado na figura 7.7.

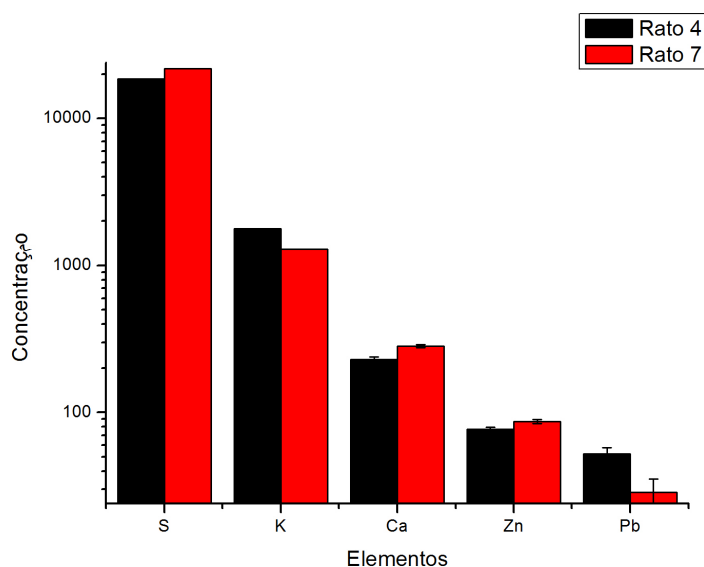


Figura 7.7: Gráfico de barras com a concentração de todos os elementos encontrados nos pêlos da barriga dos ratos 4 e 7.

Através da observação do gráfico de barras conclui-se que o rato para o qual existem maiores valores de chumbo existem também maiores valores de enxofre e de potássio e, para menores valores de chumbo existem maiores valores de zinco e de cálcio. Apenas o potássio e o zinco dos pêlos da barriga estão em de acordo com os pêlos do dorso.

7.1.2 Tecido Cancerígenos

No estudo dos tecidos cancerígenos consideram-se 10 amostras de tecidos humanos recolhidos de biópsias a pacientes com neoplasia. As amostras são de tecido de rim, de cólon e de pulmão.

Estas amostras, como mencionado anteriormente, foram analisadas por μ -XRF no equipamento Tornado.

Salienta-se que os valores apresentados encontram-se em intensidades de cada elemento a qual é directamente proporcional à concentração de cada elemento como vimos no capítulo 5, na secção 5.4.1.

7.1.2.1 Rins

Foram analisadas quatro amostras de tecido de rim, sendo duas delas saudáveis e as restantes duas com neoplasia. Os valores recolhidos por μ -XRF encontram-se no apêndice

G, na tabela G.1. Com esse valores construiu-se dois gráficos de barras com a ajuda do programa Origin que se encontram representados na figura 7.8.

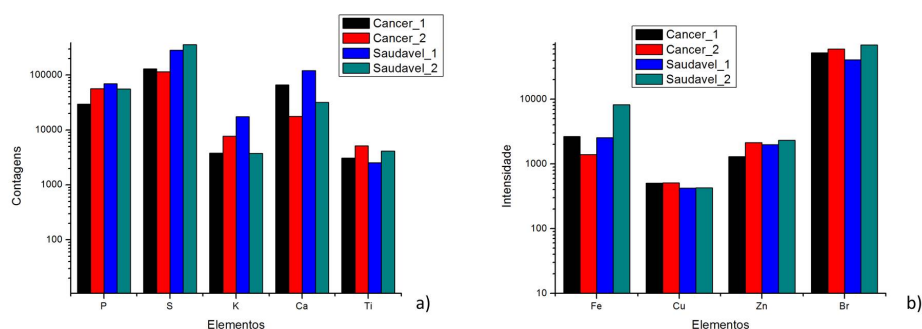


Figura 7.8: Dados recolhidos do equipamento de μ -XRF. a) Dados recolhidos utilizando o equipamento sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos utilizando o equipamento com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.

Pela observação desta figura conclui-se que o enxofre (S) se encontram em maior concentração nas amostras de tecido saudável do que nas amostras de tecido com neoplasia e que o cobre (Cu) se encontra em maior concentração nas amostras de tecido com neoplasia do que nas amostras de tecido saudável e a sua concentração em amostras com neoplasia é semelhante.

Seguidamente, para poder determinar o resultado mais geral nas variações de elementos das amostras saudáveis para as amostras com neoplasia fez-se as médias das intensidades dos elementos. Estas médias encontram-se na tabela G.2 do apêndice G. Na figura 7.9 estão representados em gráfico os resultados dessa médias.

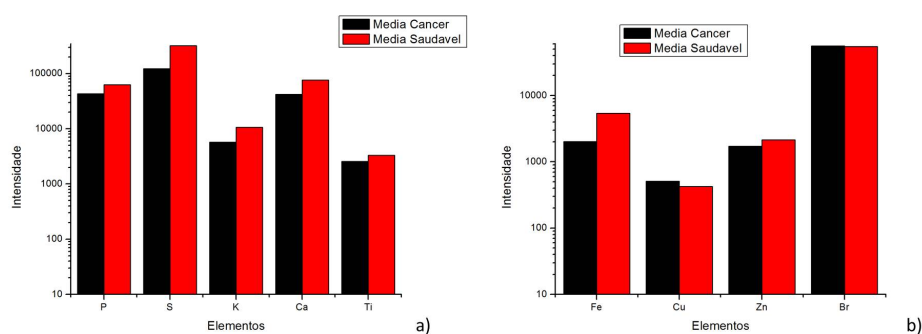


Figura 7.9: Médias dos valores das intensidades do elementos das amostra saudáveis e das amostras com neoplasia. a) Dados sem filtro. b) Dados com filtro.

Nestes gráficos observa-se que o bromo (Br) apresenta valores médios muito semelhantes para ambas as amostras e que elementos tais como o fósforo (P), o enxofre (S), o potássio (K), o cálcio (Ca), o titânio (Ti), o ferro (Fe) e o zinco (Zn) apresentam valores médios superiores para as amostras saudáveis do que para as amostras com neoplasia. Observa-se também que o cobre (Cu) se apresenta em maior concentração nas amostras com neoplasia, como já se tinha visualizado anteriormente na figura 7.8.

7.1.2.2 Cólon

Para o tecido do cólon existe, tal como para o tecido do rim, quatro amostras, sendo duas delas amostras de tecido saudável e as outras duas amostras de tecido com neoplasia. Os valores que se recolheram para estas amostras encontram-se tabelados no apêndice G na tabela G.3.

Utilizando o programa Origin construíram-se os gráficos que se encontram na figura 7.10.

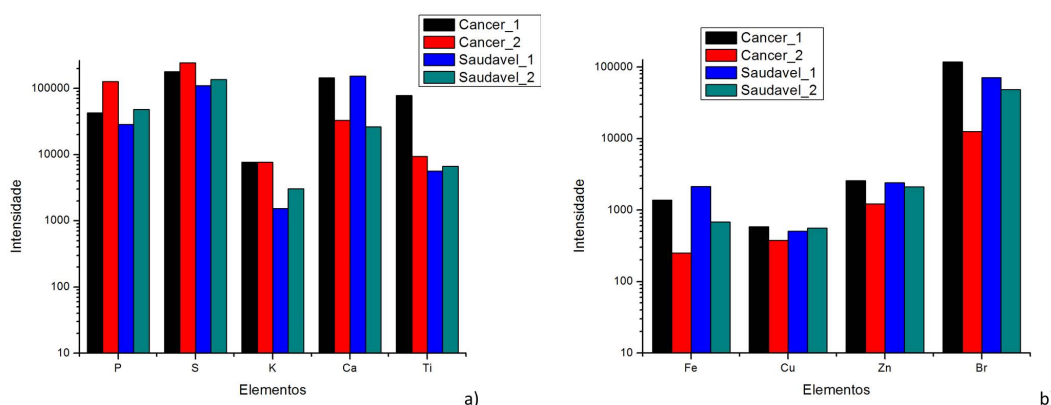


Figura 7.10: Dados recolhidos das amostras de tecido do cólon no equipamento de μ -XRF. a) Dados recolhidos no equipamento sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos no equipamento com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.

Pela observação dos gráficos acima conclui-se que apenas o enxofre (S), o potássio (K) e o titânio (Ti) apresentam uma concentração mais elevada nas amostras de tecidos com neoplasia.

Tal como foi efectuado no estudo dos rins, para uma melhor análise das diferenças entre a amostra saudável e a amostras com neoplasia fez-se as médias dos valores. Os resultados obtidos encontram-se tabelados no apêndice G na tabela G.4. A figura 7.11 apresenta dois gráficos de barras.

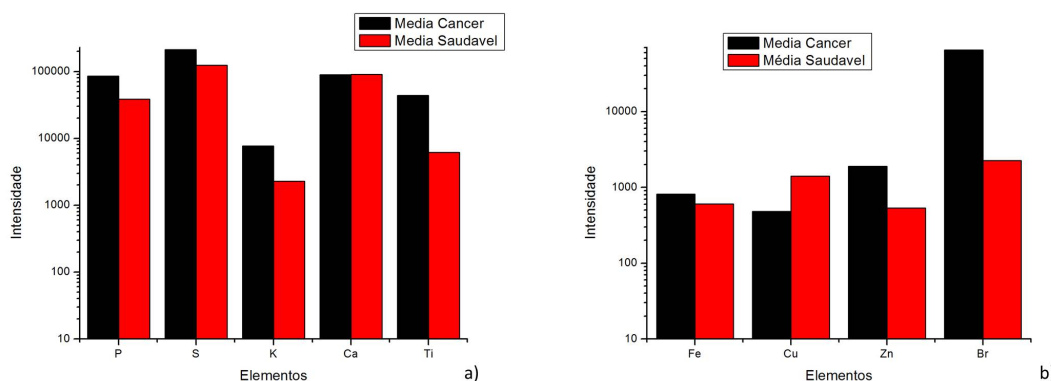


Figura 7.11: Valores médios para a amostra com neoplasia e para a amostra saudável. a) Médias sem qualquer tipo de filtro. b) Médias com o maior filtro.

Em média, o tecido com neoplasia apresenta valores de concentração mais elevados de fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), titânio (Ti), ferro (Fe), zinco (Zn) e bromo (Br). O

cálcio (Ca) apresenta uma concentração média semelhante em ambas as amostras deste tecido enquanto que o cobre (Cu) tem uma concentração média maior na amostra de tecido saudável.

7.1.2.3 Pulmão

Foram analisados duas amostras para tecido do pulmão, uma delas de tecido saudável do pulmão e a outra de tecido com neoplasia do pulmão. Os dados obtidos para as medições em μ -XRF destas amostras encontram-se tabelados no apêndice G na tabela G.5. Com estes os dados fez-se dois gráficos de barras, um com filtro e outro sem filtro, representados na figura 7.12.

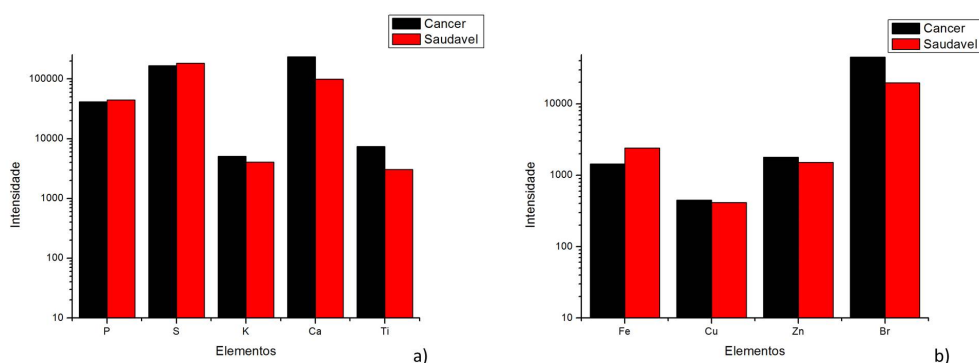


Figura 7.12: Dados recolhidos das amostras de tecido do pulmão. a) Dados recolhidos no μ -XRF sem qualquer tipo de filtro. b) Dados recolhidos no μ -XRF com o maior filtro, filtro de Alumínio, Titânio e Cobre.

Pela observação da figura acima concluímos que o fósforo (P), o enxofre (S) e o ferro (Fe) têm maiores valores para a amostra de tecido do pulmão saudável e os restantes elementos, o potássio (K), o cálcio (Ca), o titânio (Ti), o cobre (Cu), o zinco (Zn) e o bromo (Br) apresentam maiores valores de concentração na amostra de tecido com neoplasia.

7.2 Conclusões

7.2.1 Evolução do Chumbo nos Pêlos dos Ratos Wistar

Analisando os resultados obtidos neste estudo, existem três conclusões que se podem retirar. Da análise das concentrações de chumbo nos pêlos e nos órgãos pode concluir-se que, efectivamente, existe migração do chumbo não só para os órgãos internos mas também para as unhas e para os pêlos, tal como ficam evidenciados nos ratos 4 e 7. A segunda conclusão que se pode retirar relativamente à evolução do chumbo no pêlo é que ao existir uma intoxicação gradual por chumbo, existe um aumento gradual da concentração de chumbo no pêlo, visto que às 2 semanas existia uma concentração mínima de chumbo no pêlo e às 12 semanas essa concentração aumentou bastante. Por fim, pode também concluir-se que existe uma correlação entre os valores encontrados nas unhas, nos pêlos e nos rins, o que é de uma importância significativa visto este estudo nos poder fazer avançar na ideia de um posterior método de detecção, diferente da análise ao sangue, de metais pesados no organismo, a análise ao cabelo.

7.2.2 *Tecido Cancerígenos*

Olhando para os resultados obtidos para estas amostras de tecidos existem várias conclusões que se podem retirar.

A primeira delas é que entre as amostras de tecido do rim e as amostra de tecido do colon os elementos, em média, variam de forma inversa, isto é, enquanto que nos tecidos saudáveis do rim existe uma maior concentração, em média, dos certos elementos (P, S, K, Ti, Fe e Zn), estes apresentam uma concentração maior nas amostras de tecidos cancerígeno do cólon. O cobre segue, uma tendência inversa, isto é, a concentração do cobre é maior nas amostras de tecido com neoplasia do rim e nas amostras de tecido saudável do cólon.

Os elementos S, P, Fe e Cu estão em maior concentração na amostra de tecido saudável, diminuindo para a amostra com neoplasia, tal como ocorre nas amostras do tecido do rim. Os elementos K, Ti, Zn e Br estão em maior concentração na amostra com neoplasia, tendo valores menores na amostra saudável, tal como ocorre nas amostras do tecido do cólon. O único elemento que não varia em nenhum dos outros tecidos é o cálcio (Ca) que se apresenta maior na amostra de tecido com neoplasia do pulmão.

Capítulo 8

Trabalho Futuro

Os dois estudos aqui apresentados são apenas uma parte do que se poderá fazer na investigação de elementos traço nos tecidos biológicos.

O estudo dos ratos wistar poderia prolongar-se à análise de todos os órgãos de modo a perceber se realmente existe correlação entre todos os órgãos e os pêlos dos ratos wistar aquando de uma intoxicação por um metal pesado.

Seria também de grande importância perceber que relação existe entre órgãos, sangue e urina dos ratos. Deste modo, seria tentar encontrar uma correlação entre todos os factores de excreção do organismo.

Outro passo relativamente a este trabalho, seria conseguir obter uma quantificação absoluta das concentrações de chumbo em todos os órgãos. Apenas desta forma obteríamos valores para poder efectuar a comparação entre valores dos órgãos e valores dos pêlos e conseguir definir um padrão de evolução do chumbo no pêlo ao longo do tempo. A utilização do microscópio óptico também seria muito relevante na observação da estrutura exterior do pêlo, visto que existe um estudo como podemos verificar no anexo [D](#), onde se visualiza danificação do pêlo por chumbo.

Relativamente ao estudo dos tecidos cancerígenos seria também importante conseguir efectuar uma análise com mais amostras de cada órgão de modo a tentar obter uma amostra significativa que permitisse verificar se existe correlação entre órgãos e entre tecidos saudáveis e com neoplasia. É importante também conjugar em estudos posteriores factores tais como o sexo, a idade, a zona de residência, entre outros, para as amostras recolhidas em biópsias.

Bibliografia

- Al-Ebraheem, A., Farquharson, M. J., and Ryan, E. (2009). The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. *Applied Radiation and Isotopes*, 67:470–474.
- Ben-Ari, E. T. (2000). Hair today. *BioScience*, 50(4):303.
- Bencze, K. (1990). What contribution can be made to biological monitoring by hair analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 337:867–876.
- Bhuloka Reddy, S., John Charles, M., Naga Raju, G., Seetharami Deddy, B., Seshi Reddy, T., Rama Lakshmi, P., and Vijayan, V. (2004). Trace elemental analysis of cancer-afflicted intestine by pixe technique. *Biological Trace Element Research*, 102(1-3):265–281.
- Bradberry, S. and Vale, A. (2003). Lead. *Medicine*, 31:56 – 57.
- Bradberry, S. and Vale, A. (2007). Lead. *Medicine*, 35(12):627 – 628.
- Carvalho, M., Magalhães, T., Becker, M., and von Bohlen, A. (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues - a comparative study by edxrf, txrf, synchrotron radiation and pixe. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*, 62(9):1004 – 1011. 9th Rio Symposium on Atomic Spectrometry.
- Cheng, H. and Hu, Y. (2010). Lead (pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in china: A review. *Environmental Pollution*, 158(5):1134 – 1146.
- Chernova, O. (2002). Architectonic and diagnostic significance of hair cuticle. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 29(3):238–247.
- Danaei, G., Hoorn, S. V., Lopez, A. D., Murray, C. J., and Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499):1784 – 1793.
- Dirce Pozebon, V. L. D. e. A. J. C. (1999). Análise de cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. *Depto. de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - 88040-900 - Florianópolis - SC*, 22(6):838–846.
- Dunnett, M. and Lees, P. (2003). Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse. *Research in Veterinary Science*, 75(2):89 – 101.
- Filistowicz, A., Dobrzanski, Z., Przysiecki, P., Nowicki, S., and Filistowicz, A. (2011). Concentration of heavy metals in hair and skin of silver and red foxes (*vulpes vulpes*). *Environmental Monitoring and Assessment*, 182(1-4):477–484.

- Gonzalez-Fernandez, O., Queralt, I., Carvalho, M., and Garcia, G. (2007). Elemental analysis of mining wastes by energy dispersive x-ray fluorescence (edxrf). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 262(1):81 – 86.
- Gonzalez-Fernandez, O., Queralt, I., Manteca, J., Garcia, G., and Carvalho, M. (2011). Distribution of metals in soils and plants around mineralized zones at cartagena-la unión mining district (se, spain). *Environmental Earth Sciences*, 63(6):1227–1237.
- Gordon, R. T. (1978). United states patente.
- Grieken, R. E. V. and Markowicz, A. A. (2002). *Handbook of X-Ray Spectrometry - Second Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker.
- Guimaraes, D. (2007). Montagem de um espectrómetro de raios x e análise da concentração de chumbo em amostras biológicas.
- Guimaraes, D. (2010). Measurement of lead concentration in biological tissues by atomic spectroscopy techniques.
- Ide-Ektessabi, A., Fujisawa, S., Sugimura, K., Kitamura, Y., and Gotoh, A. (2002). Quantitative analysis of zinc in prostate cancer tissues using synchrotron radiation microbeams. *X-Ray Spectrometry*, 31(1):7 – 11.
- Jenner, G. A. (1996). Trace element geochemistry of igneous rocks: Geochemical nomenclature and analytical geochemistry. *Trace element Geochemistry of Volcanic Rocks: Applications For Massive Sulphide Exploration:Geological Association of Canada*, 12:51–77.
- Kanngieber, B. (2003). Quantification procedures in micro x-ray fluorescence analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58(4):609 – 614. <ce:title>16th International Conference on X-ray Optics and Microanalysis</ce:title>.
- Kanngieber, B., Malzer, W., and Reiche, I. (2003). A new 3d micro x-ray fluorescence analysis set-up : First archaeometric applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 211(2):259 – 264.
- Khudzari, J. M., Wagiran, H., Hossain, I., and Ibrahim, N. (2013). Screening heavy metals levels in hair of sanitation workers by x-ray fluorescence analysis. *Journal of Environmental Radioactivity*, 115(0):1 – 5.
- Kintz, P. (2012). Segmental hair analysis can demonstrate external contamination in post-mortem cases. *Forensic Science International*, 215:73 – 76. <ce:title>The 48th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). Joint Meeting with the Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh).</ce:title>.
- Kubala-Kukus, A., Braziewicz, J., Banas, D., Majewska, U., Gózd, S., and Urbaniak, A. Trace element load in cancer and normal lung tissue. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B - Beam Interactions with Materials and Atoms*, 150.
- Lee, S., Park, Y., Kim, J., In, S., Choi, H., Chung, H., Oh, S., and Chung, K. (2011). Feasibility of rat hair as a quality control material for the determination of methamphetamine and amphetamine in human hair. *Archives of Pharmacal Research*, 34(4):593–598.

- Magalhães, T., Carvalho, M., Bohlen, A. V., and Becker, M. (2010). Study on trace elements behaviour in cancerous and healthy tissues of colon, breast and stomach - total reflection x-ray fluorescence applications. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*, 65(6):493 – 498. A Selection of Papers Presented at the 13th Conference on Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods (TXRF 2009).
- Magalhães, T., von Bohlen, A., Carvalho, M., and Becker, M. (2006). Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual - a comparative study by txrf and edxrf. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 11th International Conference on Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry and Related Methods.
- Majewska, U., Banás, D., Braziewicz, J., Gózd, S., Kubala-Kukus, A., and Kucharzewski, M. (2007). Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 52:3895 – 3911.
- Malzer, W., Hahn, O., and Kanngiesser, B. (2004). A fingerprint model for inhomogeneous ink paper layer systems measured with micro-x-ray fluorescence analysis. *X-Ray Spectrometry*, 33(4):229–233.
- Marcano, E., Labady, M., Gomes, C., Aguiar, G., and Laine, J. (2009). High levels of Mercury and Lead detected by hair analysis in two Venezuelan environments. *Acta Amazonica*, 39:315 – 318.
- Marguí, E., Queralt, I., Carvalho, M., and Hidalgo, M. Comparison of edxrf and icp-oes after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Analytica Chimica Acta*, 549.
- Mihucz, V. G., Silversmit, G., Szalóki, I., de Samber, B., Schoonjans, T., Tatár, E., Vincze, L., Virág, I., Yao, J., and Záray, G. (2010). Removal of some elements from washed and cooked rice studied by inductively coupled plasma mass spectrometry and synchrotron based confocal micro-x-ray fluorescence. *Food Chemistry*, 121(1):290 – 297.
- Moreira, Fatima Ramos; Moreira, J. C. (2004). Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Revista Panamericana de Salud textordmasculineblica*, 15:119 – 129.
- Nano, B. (2009a). M4 tornado - high performance micro xrf spectrometer.
- Nano, B. (2009b). Physical principles of micro-x-ray fluorescence.
- Nikolas C. Papanikolaou, Eleftheria G. Hatzidaki, S. B. G. N. T. A. M. T. (2005). Lead toxicity update. a brief review. *Clinical Medicine*, pages 329–336.
- Othman, A. I. and El Missiry, M. A. (1998). Role of selenium against lead toxicity in male rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 12(6):345–349.
- Paninho, A. (2010). Análise da concentração de chumbo em sangue de ratos wistar sujeitos a uma exposição continuada.
- Philip J. Landrigan, A. C. (1994). Lead poisoning. *National Institute of Environmental Health Sciences*, pages 153–159.

- Piccinini, L., Borella, P., Bargellini, A., Medici, C., and Zoboli, A. (1996). A case-control study on selenium, zinc and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer. *Biological Trace Element Research*, 51:23 – 30.
- Prithwish, Otterstatter, M., Semenciw, R., Ellison, L., Marrett, L., and Dryer, D. (2014). Trends in incidence, mortality, and survival for kidney cancer in Canada, 2007. *Cancer Causes and Control*, 25(10):1271–1281.
- R.D.Andrews (2010). *Understanding Statistics as a Language*. Hope House Press.
- Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, P. T. (2003). Anatomia e fisiologia. (6ª edição):1118.
- Sabbar, M., Delaville, C., Deurwaerdère, P. D., Benazzouz, A., and Lakhdar-Ghazal, N. (2012). Lead intoxication induces noradrenaline depletion, motor nonmotor disabilities, and changes in the firing pattern of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*, 210(0):375 – 383.
- Schanaider, A. and Silva, P. C. (2004). Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cirurgica Brasileira*, 19:441 – 447.
- Schrauzer, G. N. (2000). Anticarcinogenic effects of selenium. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Skoog, D. A. and Leary, J. J. (1992). *Principle of Instrumental Analysis*, volume 8. Saunders College.
- Voges, D., Carl, K., Klauer, G., Uhlig, R., Schilling, C., Behn, C., and Witte, H. (2012). Structural characterization of the whisker system of the rat. *Sensors Journal, IEEE*, 12(2):332–339.
- Winneke, G. (2011). Developmental aspects of environmental neurotoxicology: Lessons from lead and polychlorinated biphenyls. *Journal of the Neurological Sciences*.
- Yuying, H., Yingrong, W., Limin, Z., Guangcheng, L., Wei, H., Lizhen, Y., Jiapi, C., Jiangfu, L., Tongcun, Z., and Enhua, C. (2001). Beijing synchrotron radiation total-reflection x-ray fluorescence analysis facility and its applications on trace element study of cells. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56(11):2057 – 2062.

Apêndice A

Patologias Associadas à Intoxicação por Chumbo

Muitas vezes as contaminações por chumbo ocorrem devido a solos e poeiras contaminadas (Philip J. Landrigan, 1994).

A tabela A.1 apresenta as principais patologias associadas à intoxicação por chumbo.

É de salientar que a toxicidade do chumbo pode ocorrer de forma orgânica ou inorgânica sendo esta ultima de baixo nível mas a que apresenta maior risco para a saúde publica (Winneke, 2011). Quando o chumbo entra em contacto com a pele o chumbo orgânico tem uma absorção maior do que o inorgânico (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

A forma inorgânica de intoxicação pode ser crónica ou aguda. A aguda apresenta risco de vida e a crónica apresenta sintomas tais como distúrbios de memória e hiperactividade (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).

A aguda é caracteriza por cólicas abdominais, constipação, fadiga, anemias, neuropatia periférica e alterações do sistema nervoso central e em caso mais graves, pode mesmo ocorrer encefalopatia aguada e mesmo o coma (Philip J. Landrigan, 1994). Por outro lado, a crónica tem sintomas dor abdominal e muscular, irritabilidade, depressão, alterações no sono.

Interacções do chumbo no organismo	
Encefalopatia	A patologia mais associada à intoxicação por chumbo (Moreira, 2004). Provém de mudanças no sistema neurológico (Sabbar et al., 2012) cujos sintomas podem passar por dores de cabeça, falta de atenção, irritação, perda de memória e a falta de interesse (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).
Anemia	Resulta da acção do chumbo sobre o tempo de vida dos eritrócitos e sobre a síntese da hemoglobina (Moreira, 2004). No entanto, não é um efeito precoce do envenenamento por chumbo. Apenas pode ser considerado como tal se a concentração de Pb-S se mantiver elevada durante um período de tempo (Moreira, 2004).
Aborto	Aborto podem estar associados a contaminações por chumbo (ocorria em mulheres que trabalhavam directamente com o chumbo) (Moreira, 2004) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005). O chumbo acumulado nos ossos transfere-se para a corrente sanguínea chegando à placenta e posteriormente ao feto (Nikolas C. Papanikolaou, 2005) causando danos tais como a redução de peso ao nascer e o nascimento prematuro.
Fertilidade	A fertilidade é reduzida para níveis de Pb-S entre 27 µg/dl e 60 µg/dl (Moreira, 2004).
neufropatia	O chumbo também se apresenta como um potencial carcinogénico renal visto que ao substituir o zinco em proteínas que auxiliam a transcrição provoca uma redução nas ligações com elementos de identificação de DNA genómico surgindo uma alteração genética (Moreira, 2004) (Philip J. Landrigan, 1994) (Nikolas C. Papanikolaou, 2005).
Hipertensão	Esta também se relaciona com doenças renais (Moreira, 2004)
Parkinson	Num estudo da doença de Parkinson conclui-se que a exposição ao chumbo pode ser um factor de risco para o desenvolvimento deste doença (Sabbar et al., 2012).

Tabela A.1: Tabela de Patologias associadas à intoxicação por Chumbo

Apêndice B

Elementos Químicos Comuns no Organismo

Elementos Químicos Comuns no Organismo Humano			
<i>Elemento</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Percentagem em Peso (%)</i>	<i>Percentagem em Número de Átomos</i>
Hidrogénio	H	9,5	63,0
Carbono	C	18,8	9,5
Azoto	N	3,3	1,4
Oxigénio	O	65,0	25,5
Sódio	Na	0,2	0,3
Fósforo	P	1,0	0,22
Enxofre	S	0,3	0,05
Cloro	Cl	0,2	0,03
Potássio	K	0,4	0,06
Cálcio	Ca	1,5	0,31
Ferro	Fe	Vestígios	Vestígios
Cobre	Cu	Vestígios	Vestígios
Zinco	Zn	Vestígios	Vestígios
Selénio	Se	Vestígios	Vestígios

Tabela B.1: Elementos Químicos Comuns no Organismo. Esta tabela contém os elementos mais importantes encontrados no organismo e as suas concentrações.

Apêndice C

Classificação do Pêlo dos Ratos Wistar

A classificação do design do cabelo reside em parâmetros tais como o número de escamas e as dimensões do eixo. Considera-se que os caracteres genéricos aparecem apenas na parte da cutícula que está na raiz. A cutícula dos reodores é uma cutícula classificada como anular-coronal, porque abrange todo o eixo do cabelo e forma uma cápsula cheia de córtex capaz de efectuar diferenciação celular longitudinal(Chernova, 2002).

A estrutura do pêlo do rato wistar apresenta escamas com arranjo rectângular que se estendem numa dimensão proximal-distal apresentando comprimento médio de $24,75\mu\text{m}$. Na figura C.1 estão representadas várias imagens do pêlo do rato wistar obtidas utilizando microscopia electrónica de varrimento (Voges et al., 2012).



Figura C.1: Fotografia obtida por SEM da estrutura do pêlo do rato Wistar (Voges et al., 2012)

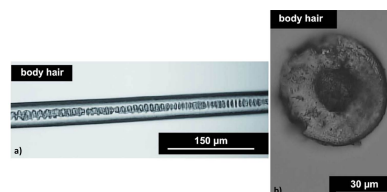


Figura C.2: Na figura a) apresenta-se a estrutura da medula do pêlo do rato wistar. Enquanto que na figura b) se apresenta um corte transversal no pêlo do rato (Voges et al., 2012)

Como se pode observar a medula do pêlo do rato wistar é preenchida por células no centro e contem um tecido compacto na sua parte mais exterior.

Apêndice D

Danificação por Chumbo do Cabelo Humano

A intoxicação por elementos traço pode originar danos na cutícula (Dirce Pozebon, 1999), mais concretamente pode originar uma quebra na cutícula e danificação das escamas que pode ser observada por microscopia electrónica de varrimento (Bencze, 1990), tal como ilustrado na figura D.1.

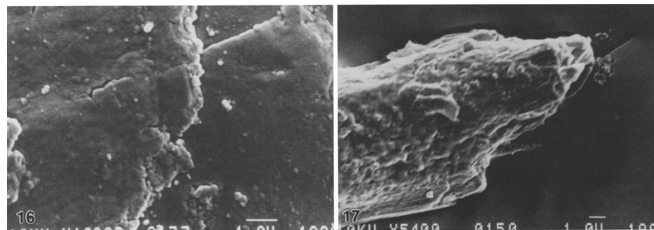


Figura D.1: Microscopia electrónica de varrimento de um cabelo que está toxicado com chumbo(Bencze, 1990)

Como as diferenças entre o pêlo do rato e o cabelo humano não englobam a estrutura química do folículo mas sim a forma deste, é de esperar que as observações no folículo capilar do rato sejam semelhantes ao que se observou na figura anterior.

Apêndice E

Consumo de chumbo pelos Ratos Wistar

Para calcular a quantidade consumida de chumbo por cada rato iremos recorrer à química. A solução efectuada foi uma mistura de acetato de chumbo com água dióxido de modo a perfazer uma solução de água com 0,2 % p/v de acetato de chumbo. O acetato de chumbo utilizado tem uma pureza de 95 % e de massa molar 443,38.

A concentração produzida foi de :

$$0,2\%p/v = \frac{0,2g}{100} \quad (E.1)$$

por 100 ml de solução.

Assim:

$$\frac{0,002 \times 0,95(pureza) \times 1(Litro)}{0,1(100ml)} = 0,019g/L \quad (E.2)$$

Assim a concentração será

$$\frac{0,019}{443,38} = 4,29 \times 10^{-5} \text{ moles} \quad (E.3)$$

A fórmula química do acetato de chumbo utilizado é $Pb(CH_3COO)_4$ sendo que assim podemos dizer que uma mole de $Pb(CH_3COO)_4$ corresponde a uma molde de Pb_{4+} .

Sabes-se da química que

$$n = \frac{m}{W}, \quad (E.4)$$

onde m é a massa, W é a massa molar e n é o número de moles
e que

$$c = \frac{n}{v}, \quad (E.5)$$

onde c é a concentração, n é o numero de moles e v é o volume de solução.

Características dos Ratos Wistar Utilizados no primeiro Experimento										
	<i>Rato</i> 1	<i>Rato</i> 2	<i>Rato</i> 3	<i>Rato</i> 4	<i>Rato</i> 5	<i>Rato</i> 6	<i>Rato</i> 7	<i>Rato</i> 8	<i>Rato</i> 9	<i>Rato</i> 10
Nome	Pb1	Pb2	Pb3	Pb4	Pb5	Pb6	Pb7	Pb8	Pb9	Pb10
Sexo	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Peso inicial (g)	408	360	438	290	400	374	430	346	378	430
Quantidade de Água bebida (L)	4,280	3,540	2,825	2,715	2,935	3,470	2,435	2,855	2,175	3,680
Quantidade de Pb Consumida (g)	0,038	0,031	0,025	0,024	0,026	0,031	0,022	0,025	0,019	0,033

Tabela E.1: Características dos Ratos Wistar

Assim podemos afirmar que:

$$c \times n \times W = \frac{m}{v} \text{ g/L}, \quad (\text{E.6})$$

onde o resultado é a quantidade de chumbo por litro.

Sabendo que a massa molar de Pb^{4+} é de 207,2 g/mol temos que:

$$4,29 \times 10^{-5} \times 1 \times 207,2 = 8,88 \times 10^{-3} \text{ g/L} \quad (\text{E.7})$$

A tabela [E.1](#) mostra as características de cada rato wistar utilizado neste experimento tal como a quantidade de água e de chumbo consumida por cada um deles.

Apêndice F

Mepeamentos

F.1 *Mapeamento Dos Rins dos Ratos Wistar*

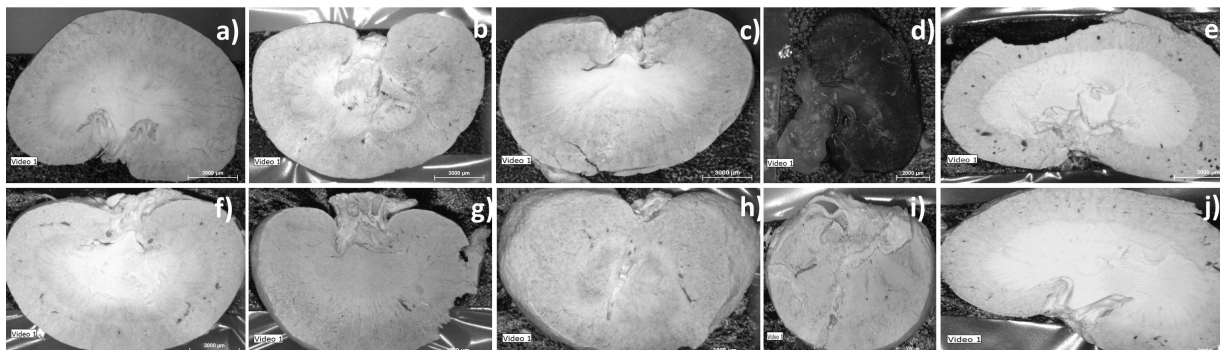


Figura F.1: Rins dos ratos Wistar utilizados neste experimento. a) rim do rato 1 (Pb1), b) rim do rato 2 (Pb2), c) rim do rato 3 (Pb3), d) rim do rato 4 (Pb4), e) rim do rato 5 (Pb5), f) rim do rato 6 (Pb6), g) rim do rato 7 (Pb7), h) rim do rato 8 (Pb8), i) rim do rato 9 (Pb9), j) rim do rato 10 (Pb10).

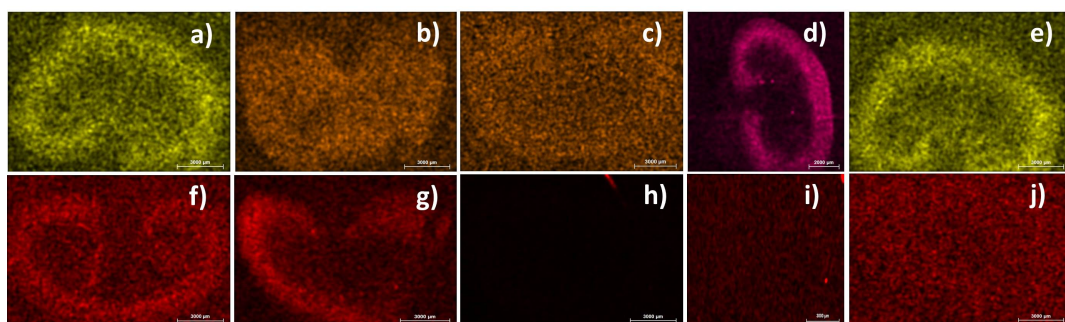


Figura F.2: Mapeamentos do Chumbo de todos os rins dos ratos. Este mapeamento funciona com intensidades de cor, quando a cor é mais intensa implica uma maior concentração do elemento.

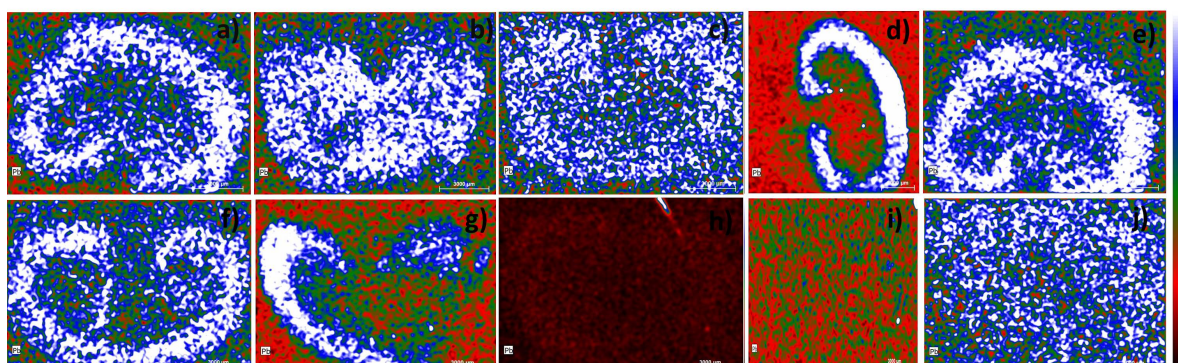


Figura F.3: Mapeamentos do Chumbo de todos os rins dos ratos com contraste. Este mapeamento tem uma gama de cores, onde a cor mais clara, neste caso o branco, apresenta uma maior concentração do elemento e o vermelho uma menor concentração do elemento.

Seguidamente são apresentados alguns mapeamentos de alguns rins de ratos. Pode verificar-se que existem diferenças em certos elementos de rim para rim, por exemplo, o cálcio do rim do rato 6 apresenta-se na parte central enquanto que o cálcio do rim do rato 7 apresenta-se disperso por todo o rim.

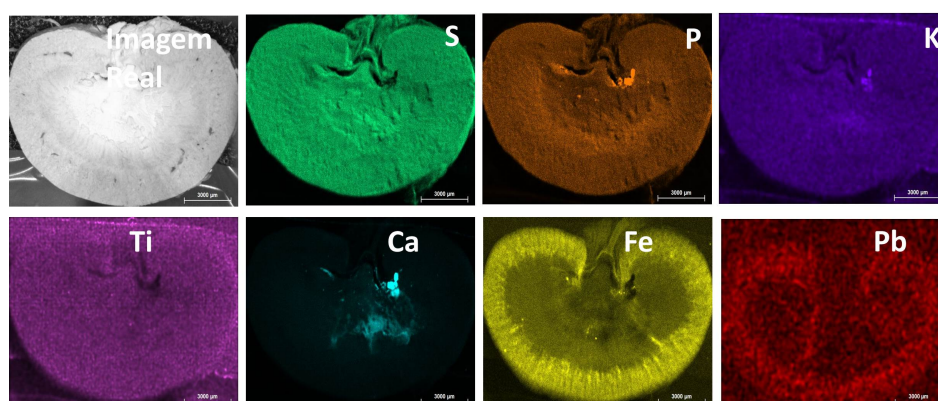


Figura F.4: Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 6

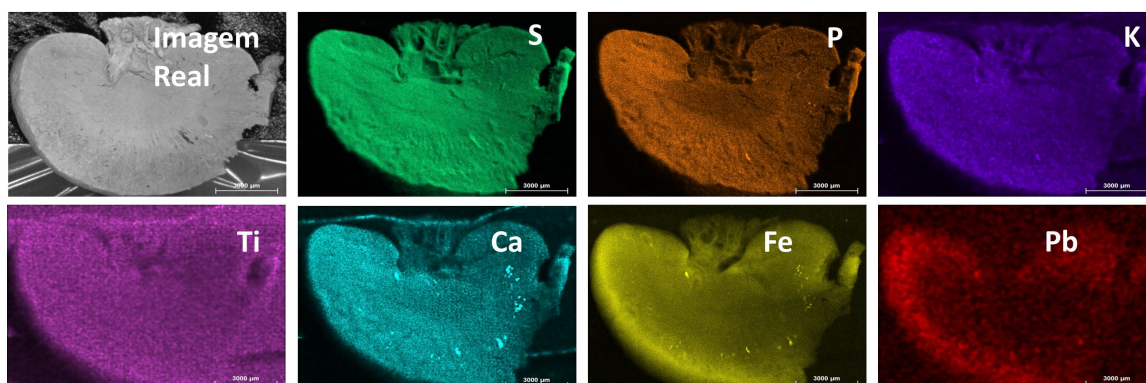


Figura F.5: Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 7

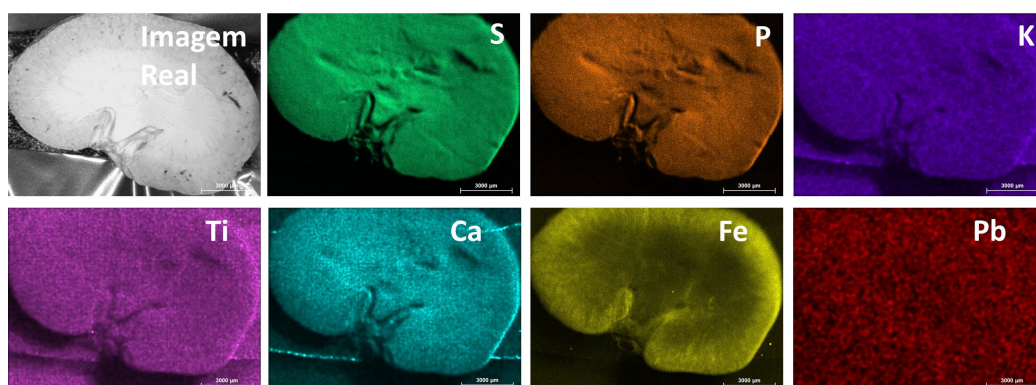


Figura F.6: Mapeamento para os vários elementos do rim do rato 10

F.2 Mapeamento das Unhas dos Ratos Wistar

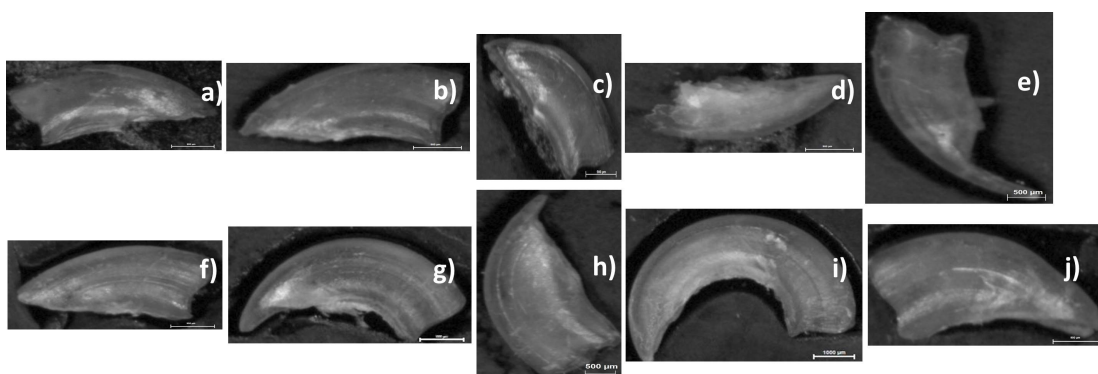


Figura F.7: Unhas dos ratos Wistar utilizados neste experimento. a) unha do rato 1 (Pb1), b) unha do rato 2 (Pb2), c) unha do rato 3 (Pb3), d) unha do rato 4 (Pb4), e) unha do rato 5 (Pb5), f) unha do rato 6 (Pb6), g) unha do rato 7 (Pb7), h) unha do rato 8 (Pb8), i) unha do rato 9 (Pb9), j) unha do rato 10 (Pb10).

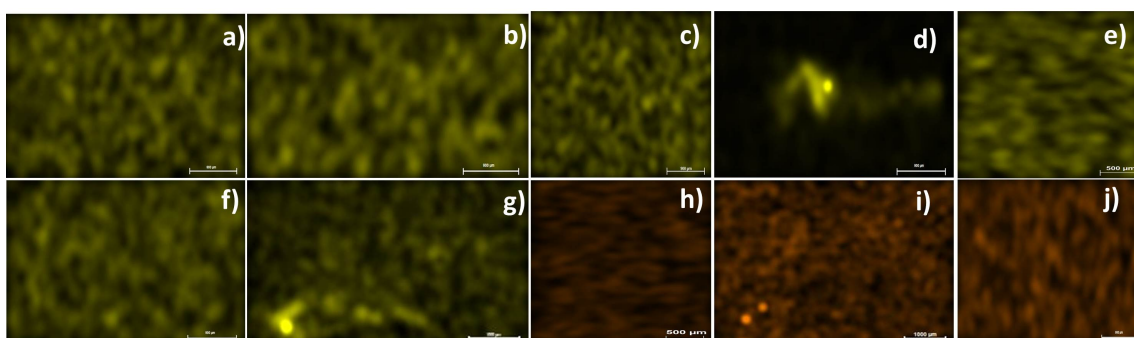


Figura F.8: Mapeamentos do Chumbo de todas as unhas dos ratos. Este mapeamento funciona com intensidades de cor, quando a cor é mais intensa implica uma maior concentração do elemento.

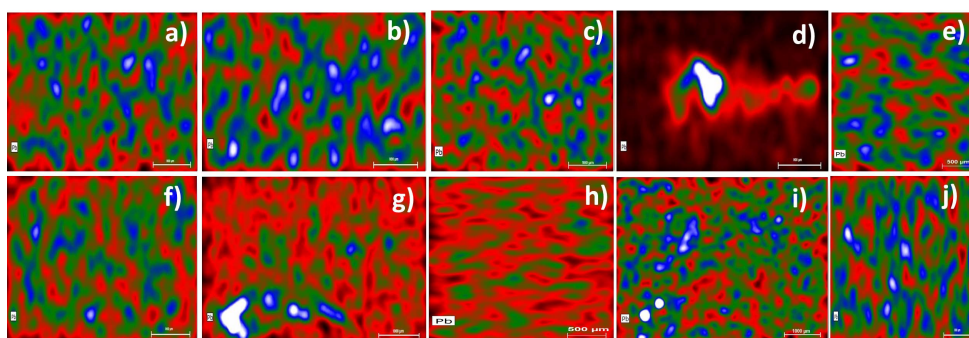


Figura F.9: Mapeamentos do Chumbo de todas as unhas dos ratos com contraste. Este mapeamento tem uma gama de cores, onde a cor mais clara, neste caso o branco, apresenta uma maior concentração do elemento e o vermelho uma menos concentração do elemento.

Seguidamente, apresentam-se alguns mapeamentos de unhas dos ratos Wistar.

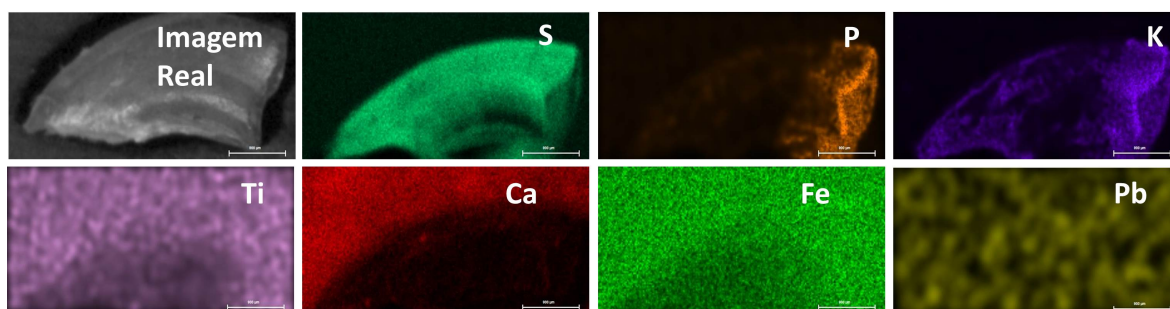


Figura F.10: Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 2

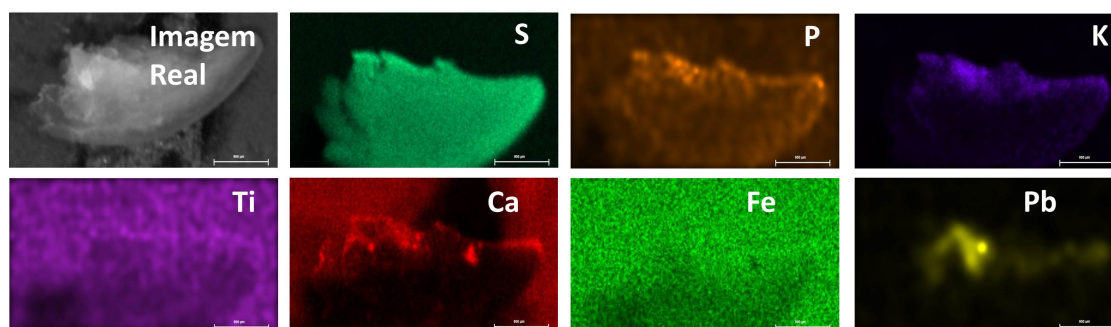


Figura F.11: Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 4

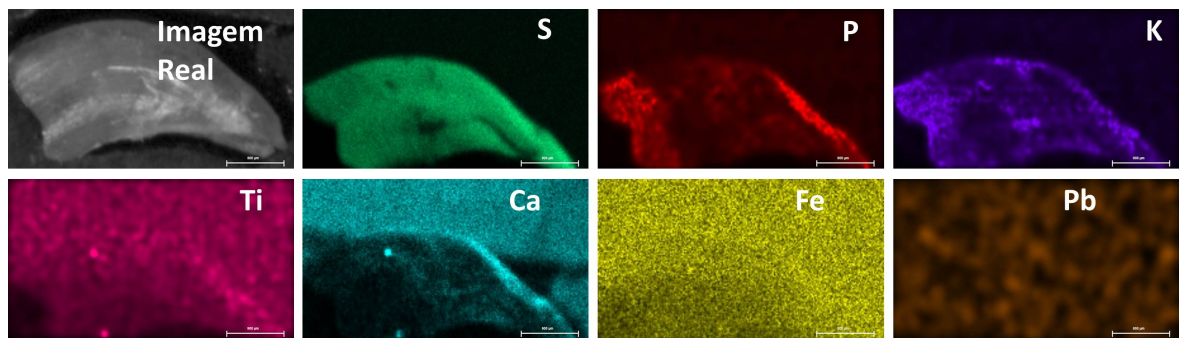


Figura F.12: Mapeamento para os vários elementos da unha do rato 10

F.3 Mapeamento dos Tecidos Cancerígenos

F.3.1 Pulmão

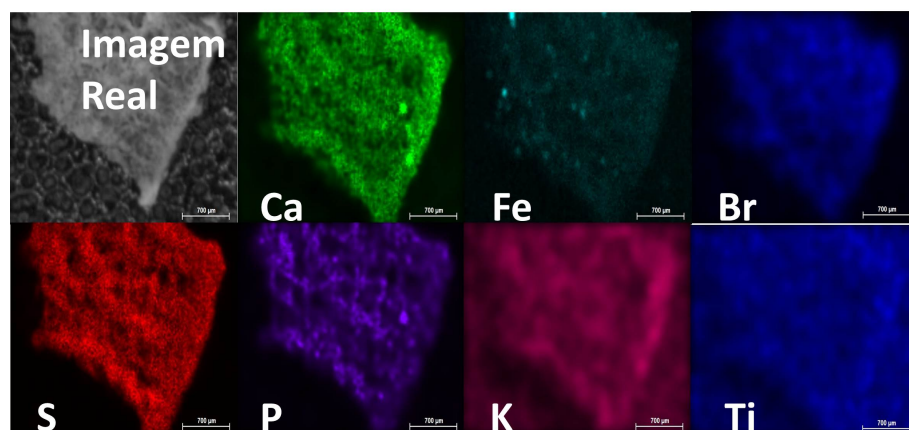


Figura F.13: Mapeamento da Amostra do Pulmão Saudável

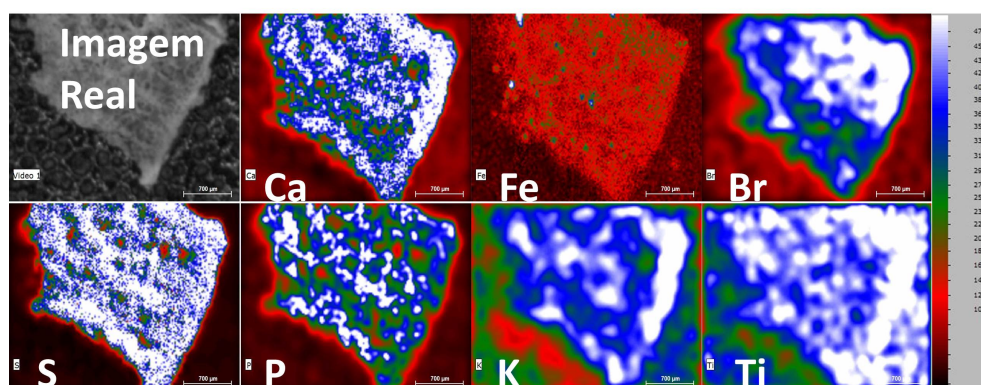


Figura F.14: Mapeamento da Amostra do Pulmão Saudável com Contraste

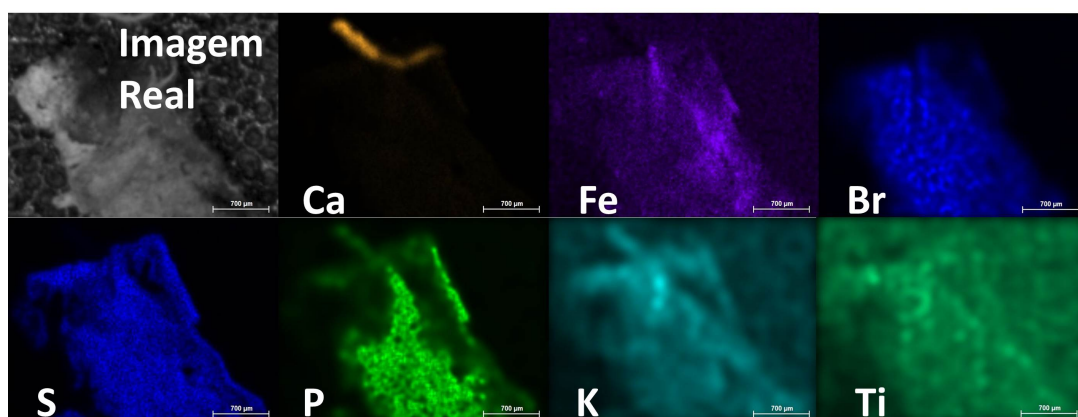


Figura F.15: Mapeamento da Amostra do Pulmão com Neoplasia

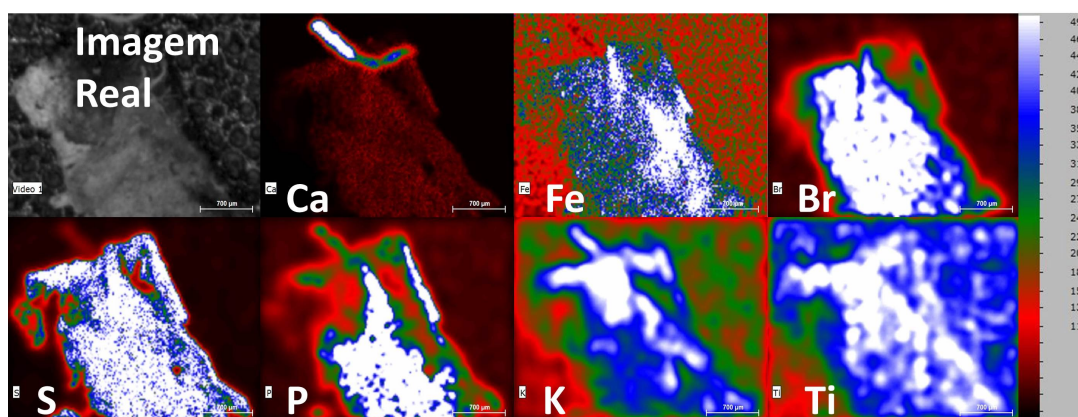


Figura F.16: Mapeamento da Amostra do Pulmão com Neoplasia com Contraste

F.3.2 Rim

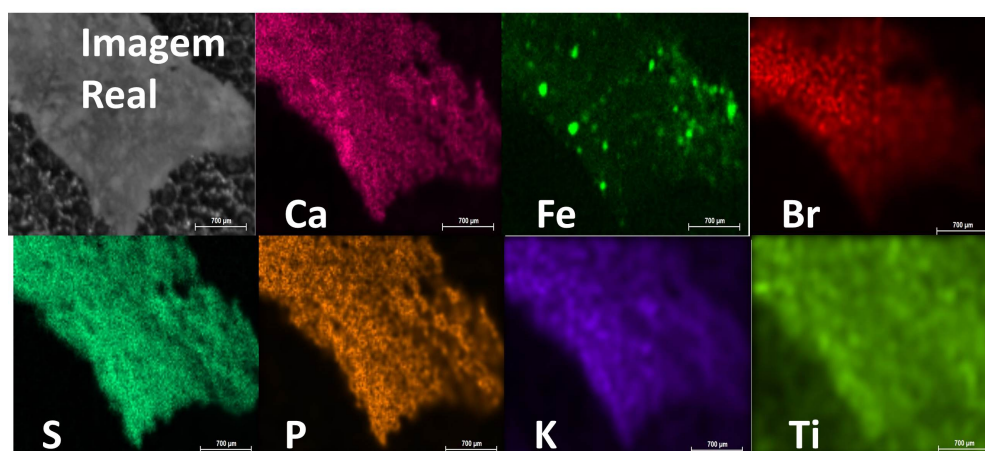


Figura F.17: Mapeamento da Amostra 1 de Rim Saudável

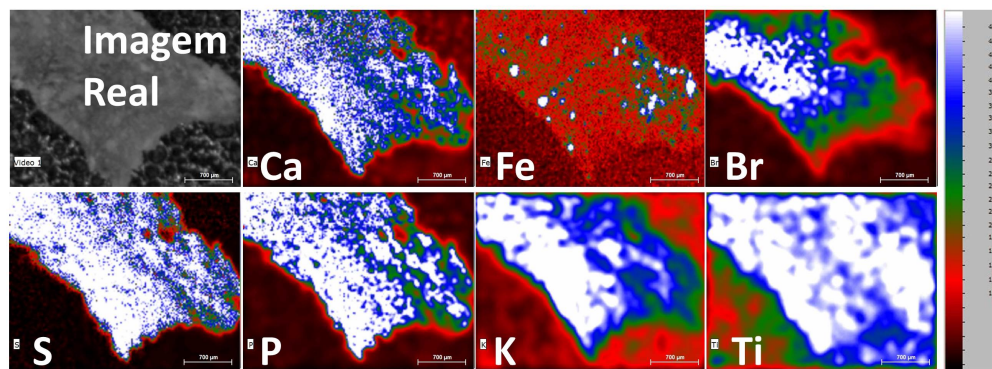


Figura F.18: Mapeamento da Amostra 1 de Rim Saudável com Contraste

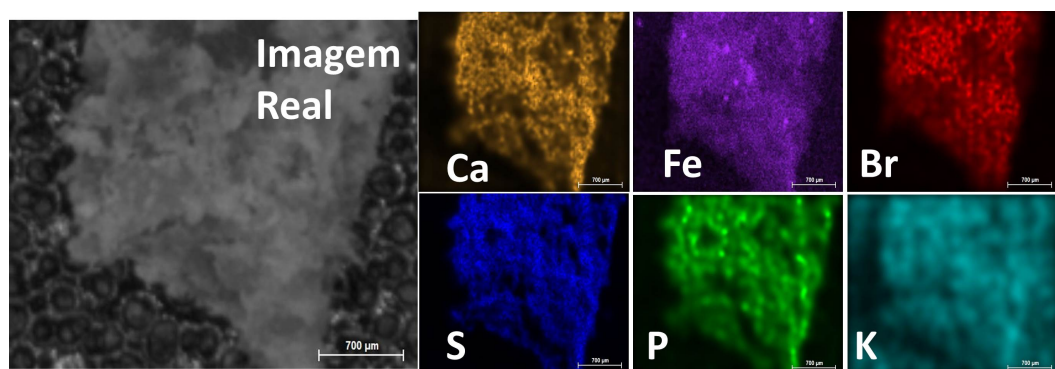


Figura F.19: Mapeamento da Amostra 1 de Rim com Neoplasia

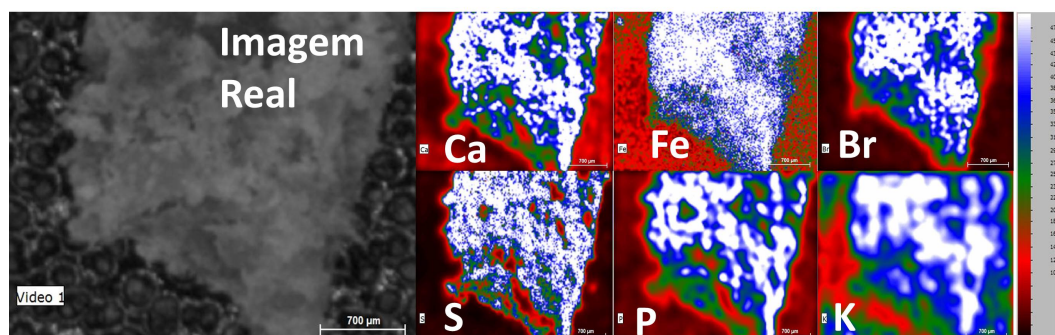


Figura F.20: Mapeamento da Amostra 1 de Rim com Neoplasia com Contraste

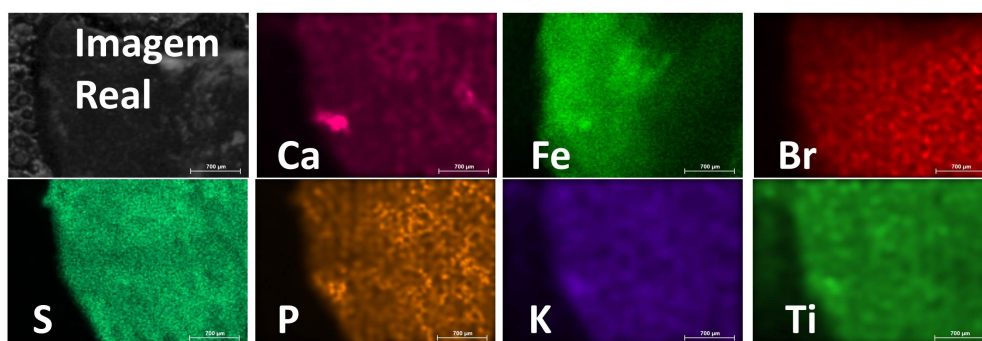


Figura F.21: Mapeamento da Amostra 2 de Rim Saudável

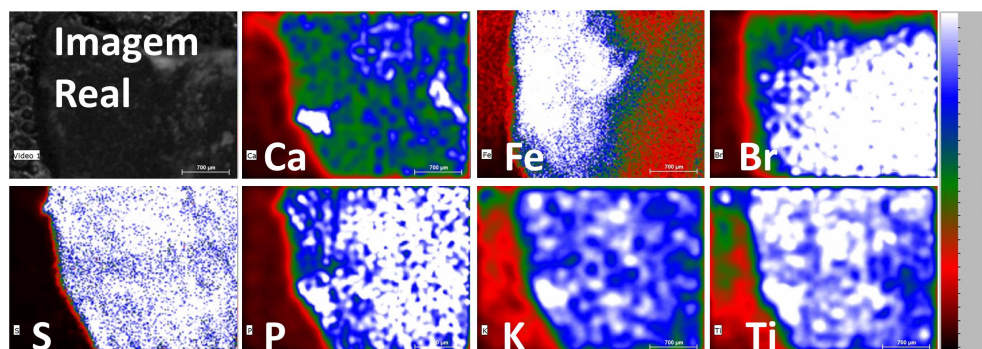


Figura F.22: Mapeamento da Amostra 2 de Rim Saudável com Contraste

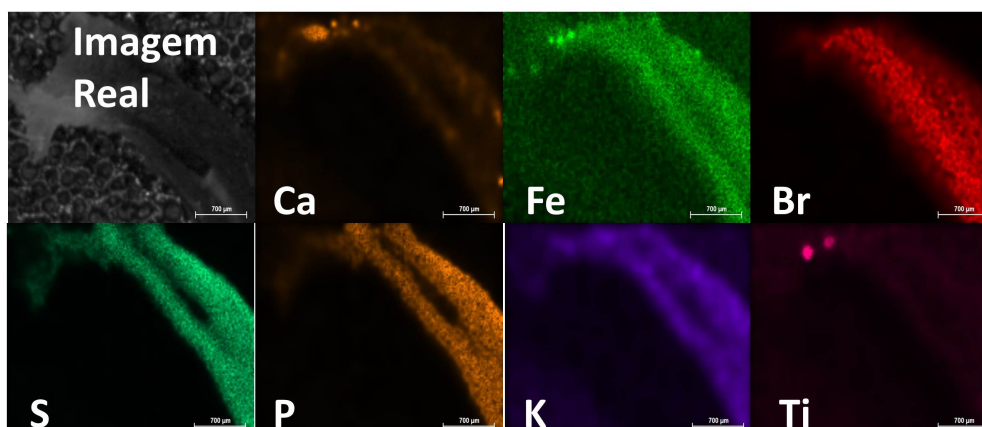


Figura F.23: Mapeamento da Amostra 2 de Rim com Neoplasia

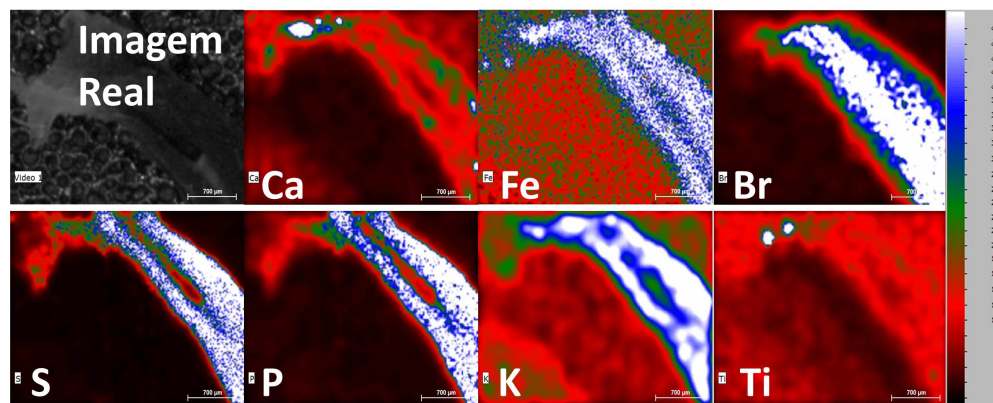


Figura F.24: Mapeamento da Amostra 2 de Rim com Neoplasia com Contraste

F.3.3 Cólon

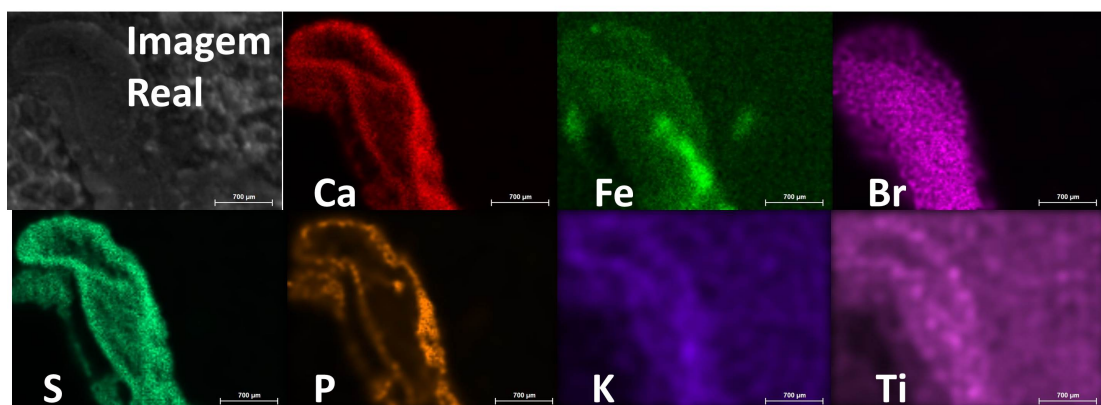


Figura F.25: Mapeamento da Amostra 1 de Cólon Saudável

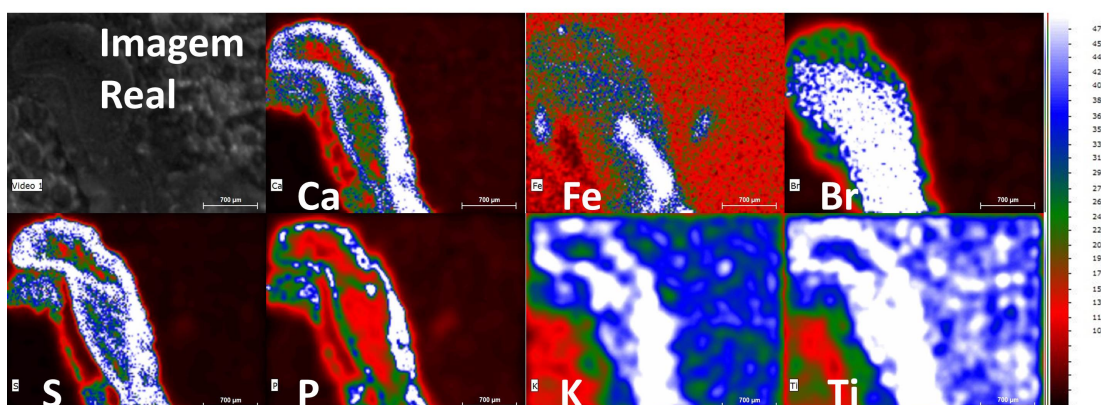


Figura F.26: Mapeamento da Amostra 1 de Cólon Saudável com Contraste

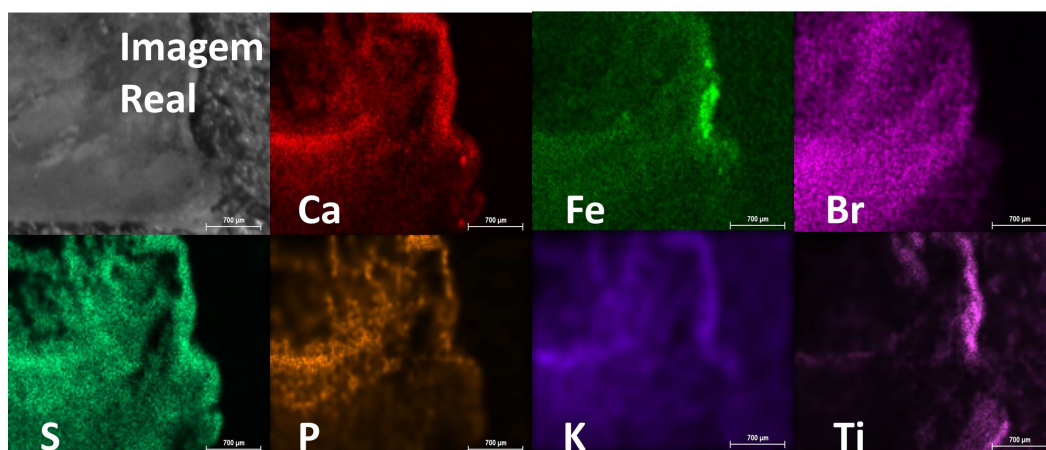


Figura F.27: Mapeamento da Amostra 1 do Cólon com Neoplasia

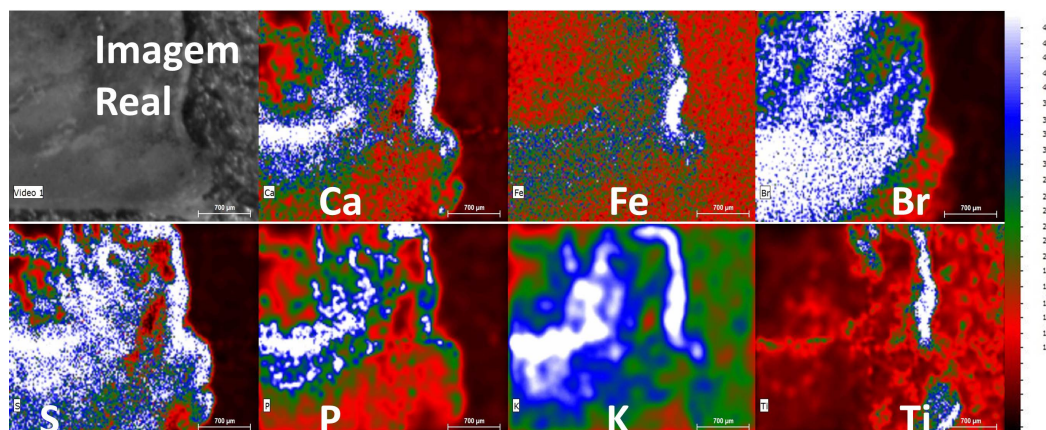


Figura F.28: Mapeamento da Amostra 1 do Cólon com Neoplasia com Contraste

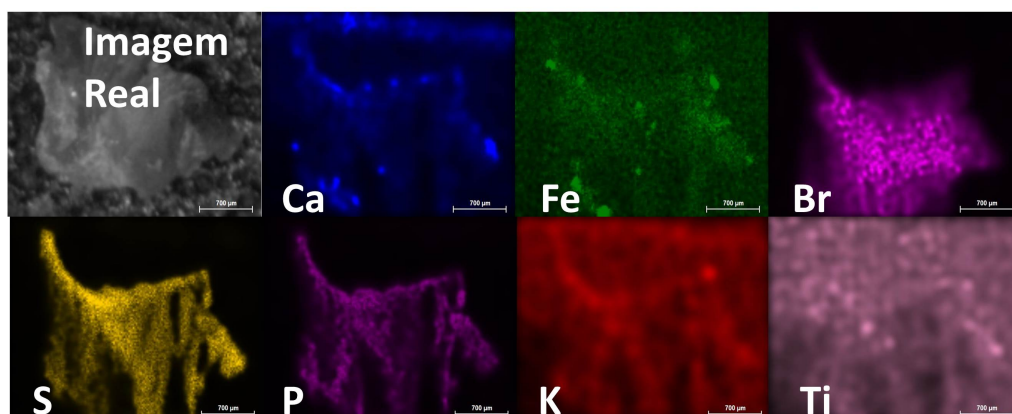


Figura F.29: Mapeamento da Amostra 2 de Cólon Saudável

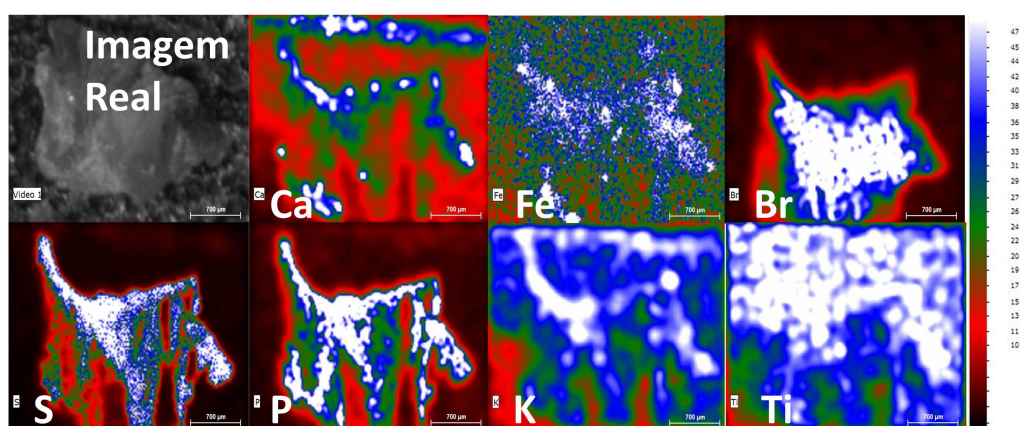


Figura F.30: Mapeamento da Amostra 2 de Cólon Saudável com Contraste

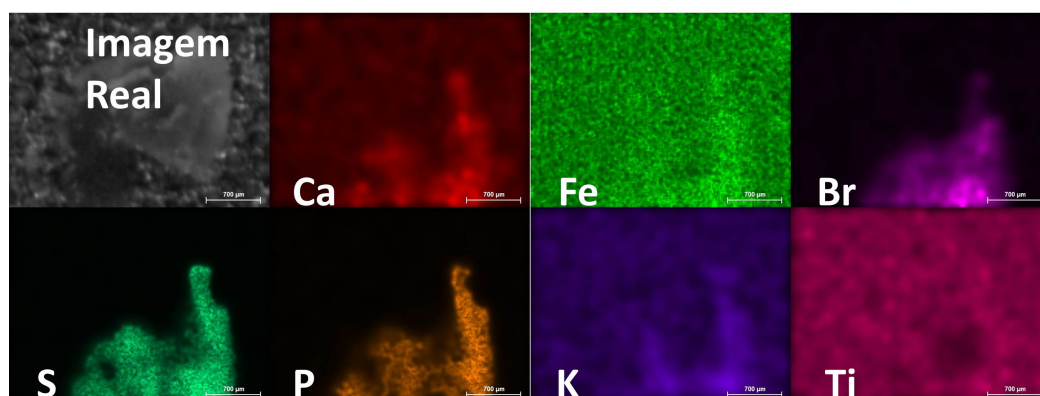


Figura F.31: Mapeamento da Amostra 2 de Cólon com Neoplasia

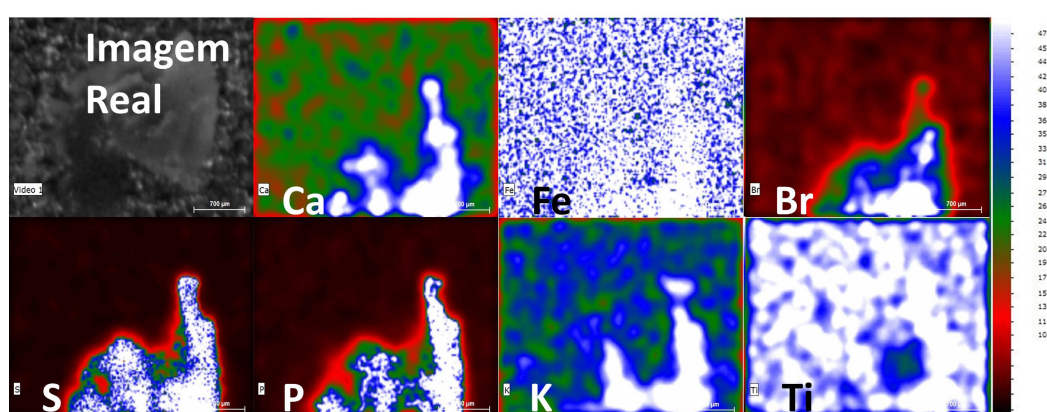


Figura F.32: Mapeamento da Amostra 2 de Cólon com Neoplasia com Contraste

Apêndice G

Dados dos Tecidos Cancerígenos

É importante referir que os valores de P, S, K, Ca e Ti foram obtidos sem filtro e que os valores de Fe, Cu, Zn e Br foram obtidos com filtro.

Valores de Intensidade para o Rim				
Elementos	Amostra com Neoplasia 1	Amostra com Neoplasia 2	Amostra Saudável 1	Amostra Saudável 2
P	29565	56604	69995	55597
S	130091	114881	286219	360754
K	3814	7668	17567	3749
Ca	66492	17715	120582	32029
Ti	3072	5135	2536	4124
Fe	2644	1397	2538	8237
Cu	505	509	422	428
Zn	1297	2135	1990	2315
Br	52099	60153	40761	69435

Tabela G.1: Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de rim.

Valores de Intensidade Média para o Rim		
Elementos	Média das Amostras com Neoplasia	Média das Amostras Saudáveis
P	43084,5	62796
S	122486	323486,5
K	5741	10658
Ca	42103,5	76305,5
Ti	2567,5	3330
Fe	2020,5	5387,5
Cu	507	425
Zn	1716	2152,5
Br	56126	55098

Tabela G.2: Valores de intensidades médias para as amostras dos tecidos de rim.

Valores de Intensidade para o Cólon				
Elementos	Amostra com Neoplasia 1	Amostra com Neoplasia 2	Amostra Saudável 1	Amostra Saudável 2
P	42662	128182	28764	48121
S	179933	244952	110444	137151
K	7655	7646	1539	3036
Ca	144777	32972	153673	26409
Ti	78265	9378	5638	6648
Fe	1372	251	2141	679
Cu	584	375	504	557
Zn	2577	1224	2416	2113
Br	117641	12496	71437	48078

Tabela G.3: Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de Cólon.

Valores de Intensidade Média para o Cólon		
Elementos	Média das Amostras com Neoplasia	Média das Amostras Saudáveis
P	85422	38442,5
S	212442,5	123797,5
K	7650,5	2287,5
Ca	88874,5	90041
Ti	43821,5	6143
Fe	811,5	603,5
Cu	479,5	1410
Zn	1900,5	530,5
Br	65068,5	2264,5

Tabela G.4: Valores de intensidades médias para as amostras dos tecidos de cólon.

Valores de Intensidade para o Pulmão		
Elementos	Amostra com Neoplasia	Amostra Saudável
P	41454	44409
S	168233	183888
K	5069	4077
Ca	236571	98974
Ti	7364	3070
Fe	1443	2394
Cu	448	415
Zn	1788	1507
Br	45195	19611

Tabela G.5: Valores de intensidades para as amostras dos tecidos de pulmão.

Valores de Intensidade para as amostras com Neoplasia			
Elementos	Amostra do Pulmão	Média das Amostras do Rim	Média das Amostras do Cólon
P	41454	43084,5	85422
S	168233	122486	212442,5
K	5069	5741	7650,5
Ca	236571	42103,5	88874,5
Ti	7364	2567,5	43821,5
Fe	1443	2020,5	811,5
Cu	448	507	479,5
Zn	1788	1716	1900,5
Br	45195	56126	65068,5

Tabela G.6: Valores de intensidades para as amostras com neoplasia dos tecidos de pulmão, rim e cólon.

Valores de Intensidade para as Amostras com Saudáveis			
Elementos	Amostra do Pulmão	Média das Amostras do Rim	Média das Amostras do Cólon
P	44409	62796	38442,5
S	183888	323486,5	123797,5
K	4077	10658	2287,5
Ca	98974	76305,5	90041
Ti	3070	3330	6143
Fe	2394	5387,5	603,5
Cu	415	425	1410
Zn	1507	2152,5	530,5
Br	19611	55098	2264,5

Tabela G.7: Valores de intensidades para as amostras saudáveis dos tecidos de pulmão, rim e cólon.

Apêndice H

Análise de Dados dos Ratos Wistar

Seguidamente apresentam-se os teste de U-Mann Whitney que foram realizados de modo a determinar se as amostras de rins, unhas e pêlos se apresentavam significativamente diferentes aquando da comparação da razão entre ratos contaminados e ratos de controlo.

Existem dois valores que resultam do teste U-Mann Whitney, o U e o Z. Para que as distribuições se apresentem significativamente diferentes, o valor de U tem de se apresentar como um valor elevado e $Z < -1,96$ e $Z > 1,96$.

Nas tabelas seguintes estão listados os resultados para estes testes.

Teste U-Mann Whitney para o Rim		
U	Z	Prob> U
21	2,30735	0,02104

Tabela H.1: Teste U-Mann Whitney para o rim.

Nas tabelas [H.9](#) e [H.10](#) [H.11](#) [H.12](#) apresentam-se os resultados dos testes U-Mann Whitney efectuados para o rim.

Teste U-Mann Whitney para a Unha		
U	Z	Prob> U
13,5	0,81325	0,41607

Tabela H.2: Teste U-Mann Whitney para a unha.

Teste U-Mann Whitney para os Pêlos do Dorso		
U	Z	Prob> U
16,5	1,41227	0,15787

Tabela H.3: Teste U-Mann Whitney para os pêlos do dorso.

Teste U-Mann Whitney para os Pêlos da Barriga		
U	Z	Prob> U
15	1,12169	0,26199

Tabela H.4: Teste U-Mann Whitney para os pêlos da barriga

Elementos Existentes no pêlo da Barriga do Rato 4				
Elementos	Primeira Recolha	Incerteza (%)	Última Recolha	Incerteza (%)
S	6656,63	16,5	18543,80	3,9
Cl	491,56	25,9	1541,50	8,8
K	935,94	12,3	1780,66	3,5
Ca	0,00	0	230,13	8,4
Zn	68,83	12,5	76,66	3
Pb	0,00	0	52,49	4,9

Tabela H.5: Dados da primeira e última recolha de pêlos da Barriga do rato 4 (rato contaminado)

Elementos Existentes no pêlo do Dorso do Rato 4				
Elementos	Primeira Recolha	Incerteza (%)	Última Recolha	Incerteza (%)
S	10014,83	6	22668,79	3,8
Cl	540,75	21,3	1289,76	13,2
K	586,92	7,7	2194,84	3,8
Ca	405,55	6,9	528,04	6,3
Zn	62,93	4,5	98,49	3,3
Pb	37,53	7,6	615,36	1,6

Tabela H.6: Dados da primeira e última recolha de pêlos do dorso do rato 4 (rato contaminado)

Elementos Existentes no pêlo da Barriga do Rato 7				
Elementos	Primeira Recolha	Incerteza (%)	Última Recolha	Incerteza (%)
S	68052,67	18,2	21900,43	3,6
Cl	0,00	0	1431,98	12,1
K	0,00	0	1290,75	4,2
Ca	13059,98	11,3	282,31	7,2
Fe	0,00	0	23,77	9,5
Zn	900,21	13,7	86,46	2,7
Pb	0,00	0	28,69	6,7

Tabela H.7: Dados da primeira e última recolha de pêlos da Barriga do rato 7 (rato contaminado)

Elementos Existentes no pêlo do Dorso do Rato 7				
Elementos	Primeira Recolha	Incerteza (%)	Última Recolha	Incerteza (%)
S	8425,14	6,2	28226,82	3,1
Cl	684,33	14	2142,42	8,4
K	1126,16	4,2	1217,93	4,5
Ca	214,62	7,8	438,18	5,7
Fe	0,00	0	23,94	10,1
Zn	39,40	3,7	115,47	2,4
Pb	21,05	8,6	220,17	2,1

Tabela H.8: Dados da primeira e última recolha de pêlos do dorso do rato 7(rato contaminado)

Teste U-Mann Whitney para o S		
U	Z	Prob> U
21	2,27921	0,02265

Tabela H.9: Teste U-Mann Whitney para o elemento S dos rins.

Teste U-Mann Whitney para o K		
U	Z	Prob> U
21	2,27921	0,02265

Tabela H.10: Teste U-Mann Whitney para o elemento K dos rins.

Teste U-Mann Whitney para o Ca		
U	Z	Prob> U
21	2,27921	0,02265

Tabela H.11: Teste U-Mann Whitney para o elemento Ca dos rins.

Teste U-Mann Whitney para o Zn		
U	Z	Prob> U
21	2,27921	0,02265

Tabela H.12: Teste U-Mann Whitney para o elemento Zn dos rins.

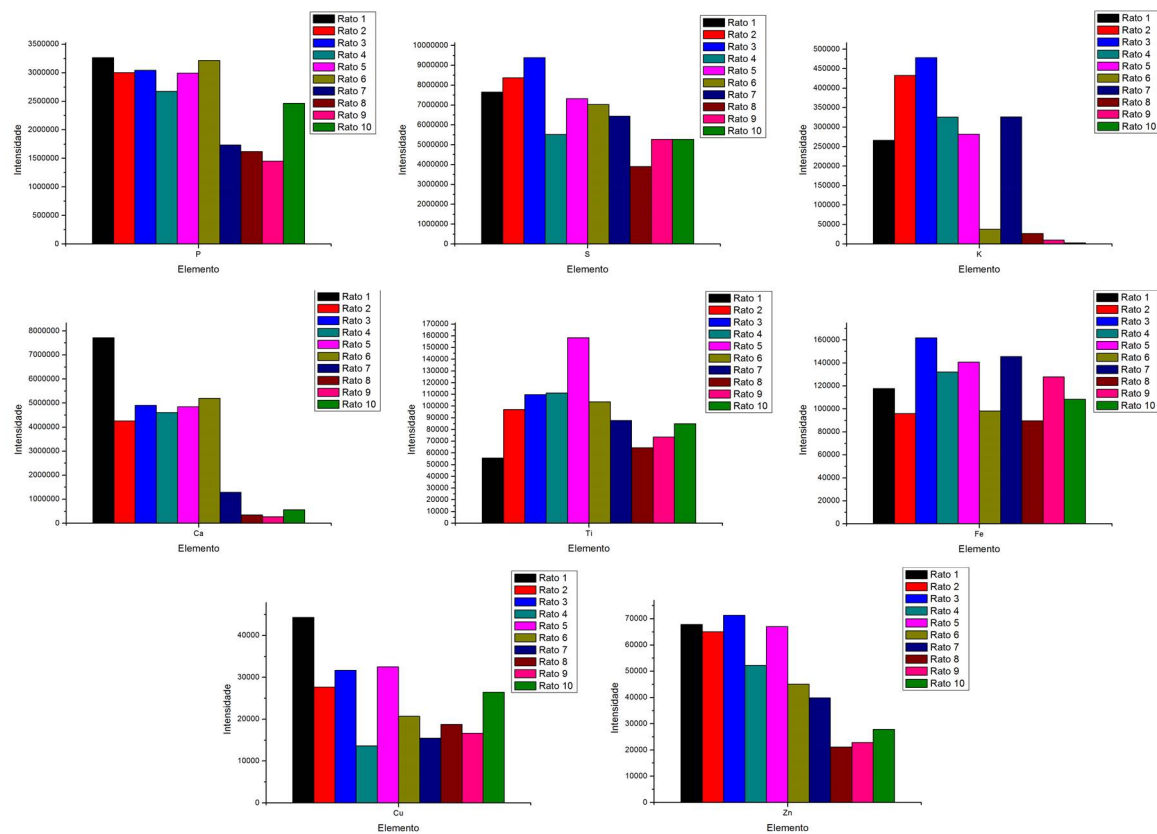


Figura H.1: Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos rins de cada rato em função das suas concentrações.

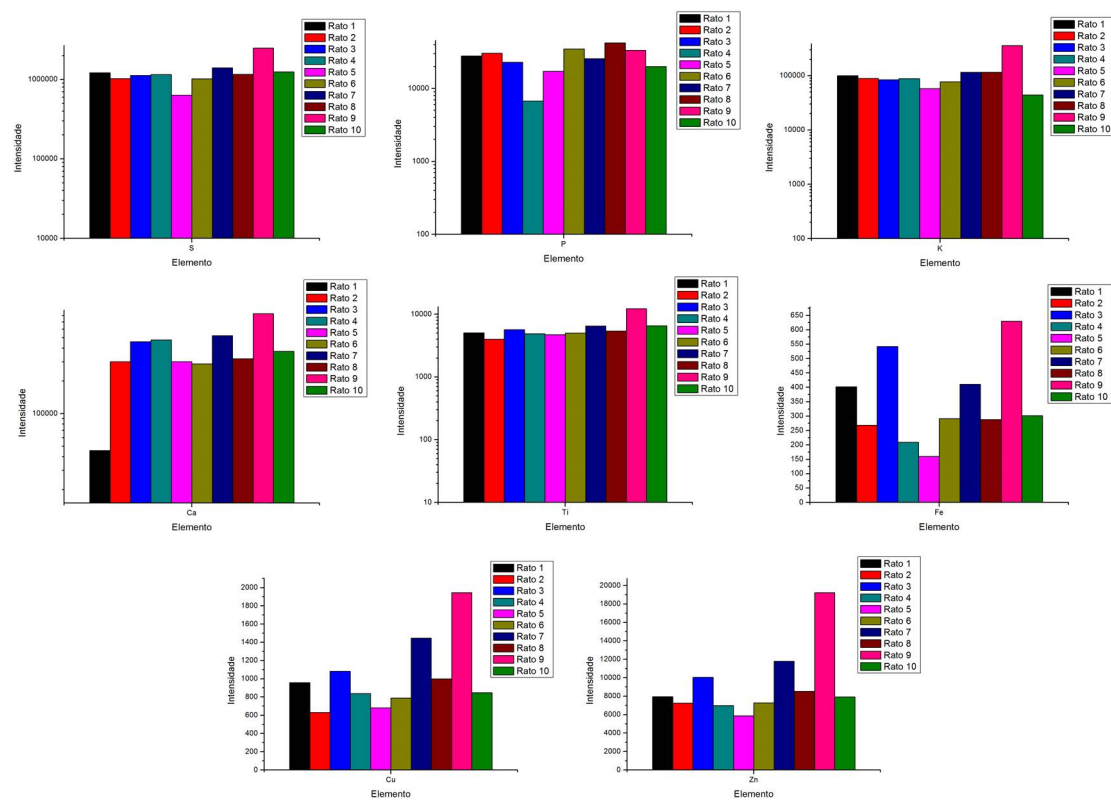


Figura H.2: Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nas unhas de cada rato em função das suas concentrações.

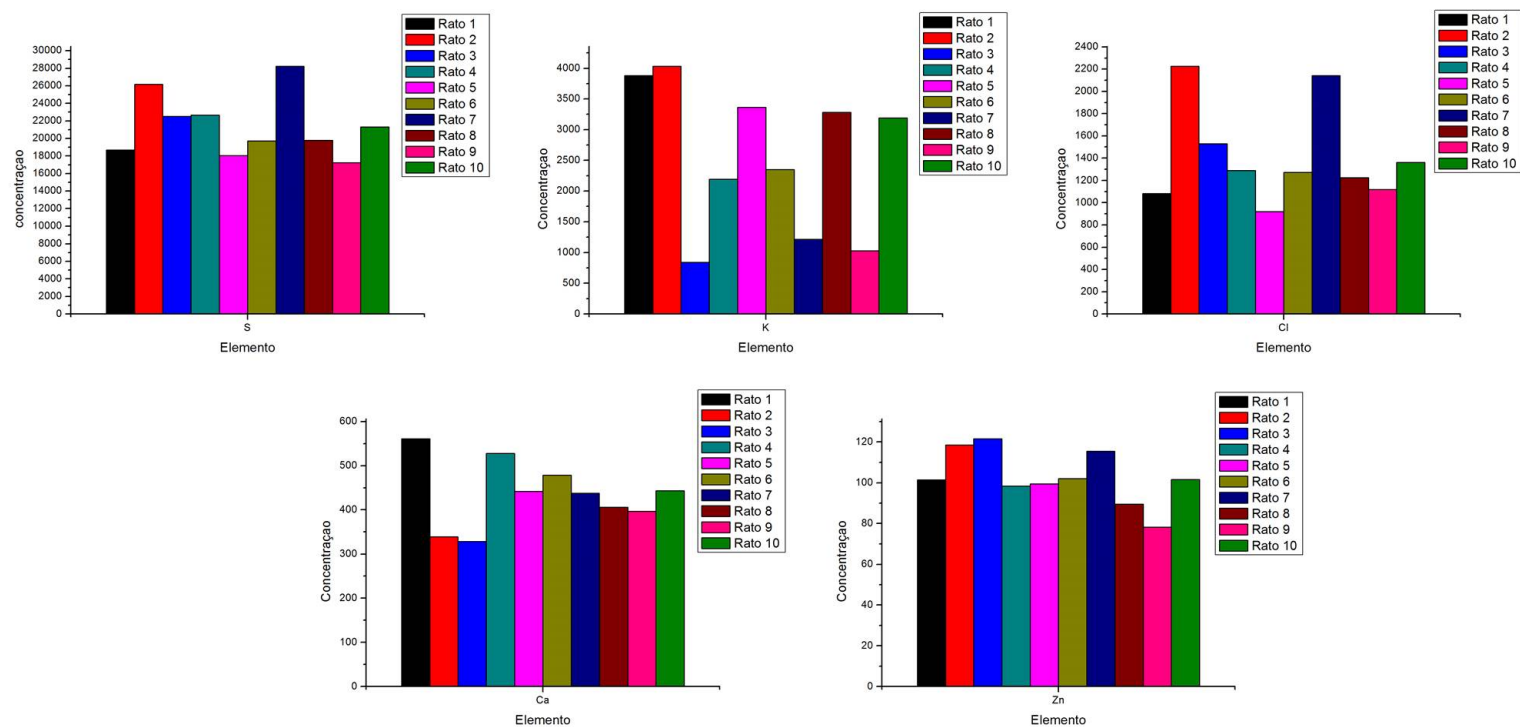


Figura H.3: Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos pêlos do dorso de cada rato wistar.

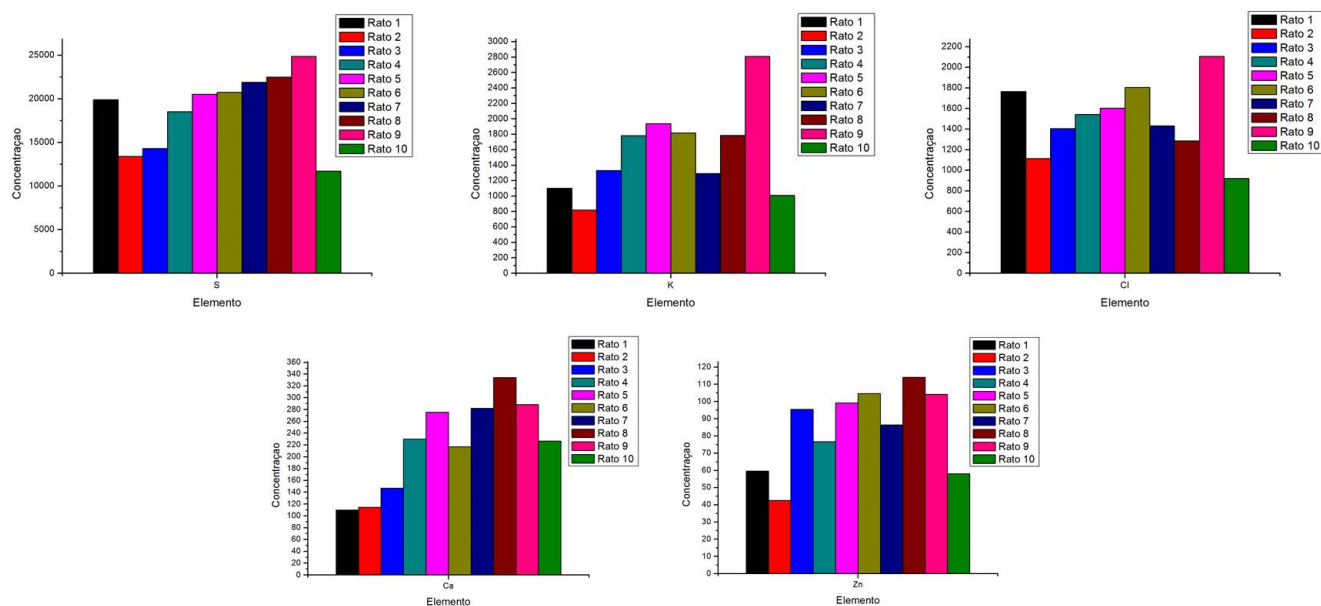


Figura H.4: Gráficos correspondentes a todos os elementos encontrados nos pêlos da barriga de cada rato wistar.

Valores de Intensidade de S, K, Ca, Zn e Pb para todos os Rins de todos os Ratos										
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10
S	7,66E6	8,38E6	9,39E6	5,53E6	7,32E6	7,03E6	6,44E6	3,91E6	5,28E6	5,27E6
K	266365	432529	478510	325913	282181	38007	326382	26916	10324	3352
Ca	7,72E6	4,26E6	4,91E6	4,61E6	4,84E6	5,20E6	1,29E6	345746	268469	560929
Zn	67863	65038	71344	52252	66981	45065	39909	21183	22857	27873
Pb	24594	27065	1249	49778	7893	16916	38143	0,00	0,00	0,00

Tabela H.13: Tabela com todos os valores de intensidade dos elementos analisados anteriormente para cada rato.

Valores de Intensidade de Ca e Pb para as unhas de todos os Ratos										
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10
Ca	45620	300890	458775	478269	300522	286557	522719	319891	0,00	375386
Pb	0,00	0,00	0,00	3859	0,00	0,00	403	0,00	0,00	0,00

Tabela H.14: Tabela com os valores de intensidade de Ca e Pb para cada rato.

Valores de Concentração dos Elementos presentes nos Pêlos do Dorso de todos os Ratos										
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10
S	18685,29	26149,17	22523,15	122668,74	18059,09	19700,43	28226,82	19785,72	17224,01	21320,26
Cl	1081,74	2226,16	1529,02	1289,76	920,36	1273,10	2142,42	1224,89	1119,71	1362,54
K	3879,90	4032,50	839,68	2194,84	3363,46	2351,29	1217,93	3284,51	1029,90	3193,66
Ca	561,21	338,88	328,38	528,04	442,15	478,57	438,18	405,78	396,53	443,31
Zn	101,44	118,48	121,64	98,49	99,48	102,01	115,47	89,46	78,18	101,61
Pb	0,00	5,10	0,00	593,94	0,00	18,74	198,75	0,00	0,00	0,00

Tabela H.15: Tabela com os valores de concentração de todos os elementos dos pêlos do dorso.

Valores de Concentração dos Elementos presentes nos Pêlos da Barrigade todos os Ratos										
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10
S	19909,41	13407,40	14318,77	18543,80	20531,30	20734,97	21900,43	22500,45	24865,33	11708,65
Cl	1765,82	1114,09	1403,60	1541,49	1602,93	1804,53	1431,98	1285,05	2106,42	920,38
K	1101,79	817,56	1328,73	1780,66	1938,12	1818,33	1290,76	1783,77	2809,36	1008,44
Ca	110,10	114,61	146,70	230,13	275,67	217,01	282,31	334,29	288,28	226,84
Zn	59,610	42,50	95,42	76,67	99,11	104,63	86,46	114,09	104,17	58,04
Pb	0,00	18,89	0,00	52,49	0,00	0,00	28,67	0,00	0,00	0,00

Tabela H.16: Tabela com os valores de concentração de todos os elementos dos pêlos da barriga.

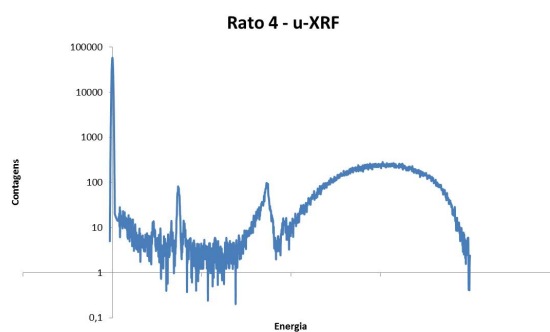


Figura H.5: Espectro retirado do equipamento de micro-fluorescência de raios-X. Este espectro representa a medição feita neste equipamento ao pêlo do dorso do Rato 4.

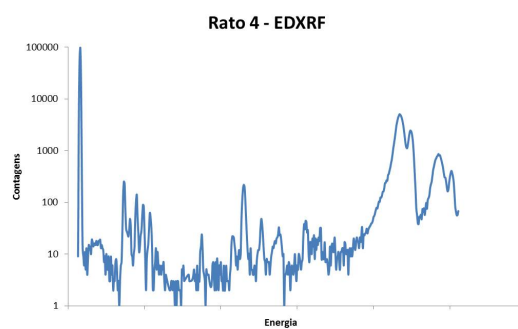


Figura H.6: Espectro retirado do equipamento de EDXRF. Este espectro representa a medição feita neste equipamento ao pêlo do dorso do Rato 4.